

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Prevención de la anafilaxia con antígenos del anisakis simplex
en un modelo animal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Guadalupe Marco Martín

DIRECTORES

**María Luisa Baeza Ochoa de Ocáriz
José Manuel Zubeldia Ortuño
Pedro Antonio Reche Gallardo**

Madrid, 2017

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INMUNOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**PREVENCIÓN DE LA ANAFILAXIA CON ANTÍGENOS DEL *ANISAKIS*
SIMPLEX EN UN MODELO ANIMAL**

Presentada por:

Guadalupe Marco Martín

Co-dirigida por:

María Luisa Baeza Ochoa de Ocáriz

Jose Manuel Zubeldia Ortuño

Pedro Antonio Reche Gallardo

Madrid, 2015

D^a. Maria Luisa Baeza Ochoa de Ocáriz, D. José Manuel Zubeldía Ortuño y D. Pedro Antonio Reche Gallardo

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado "Prevención de la anafilaxia con antígenos del *Anisakis simplex* en un modelo animal", ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada en Medicina D^a Guadalupe Marco Martín, y reúne todos los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que así conste a todos los efectos, se extiende la presente certificación en Madrid,
a ____ de _____ de 2015.



D^a. Maria Luisa Baeza Ochoa de Ocáriz



D. José Manuel Zubeldía Ortuño



D. Pedro Antonio Reche Gallardo

A mis padres

Agradecimientos

Este trabajo ha sido desarrollado en la Unidad de Medicina Experimental del Hospital Gregorio Marañón. Quiero agradecer a todo su personal, especialmente al equipo de veterinarios, el trabajo realizado ya que sin vuestra ayuda este trabajo no habría podido desarrollarse. No quisiera olvidarme de todos los investigadores, compañeros, que trabajan en esta unidad a los que he recurrido en más de una ocasión y, en muchas de ellas, al borde del colapso. Gracias a todos.

Además, me gustaría agradecer con todo mi cariño a mis directores. En primer lugar, a la Dra. María Luisa Baeza, por haberme iniciado y sumergido de lleno en este mundo de la investigación. Tu capacidad didáctica, tu disponibilidad, buena voluntad y entusiasmo por este campo son algunas de las múltiples cualidades que he tenido la suerte de descubrir en estos años. Gracias por enseñarme tanto. También quisiera agradecer al Dr. José Zubeldia no sólo la dirección de esta tesis, sino también su esfuerzo y el apoyo recibido en estos años. Igualmente, al Dr. Pedro Reche por la inestimable ayuda en el mundo de la inmunología facilitándome su comprensión.

También agradecer al Servicio de Alergia del Hospital Gregorio Marañón, donde muchos de vosotros habéis participado de forma directa en alguna parte de esta tesis y otros nos habéis acompañado en este largo camino. En especial a Alberto, por haberme ayudado en esta etapa final. También agradecer al Servicio de Alergia del Hospital Clínico, grandes sufridoras de mis últimas etapas de esta tesis doctoral.

No me puedo olvidar de Alejandro la Rotta, mi R mayor con mayúsculas. Me descubriste el mundo de la alergia y cómo pasar el día entre “manis”, ratones y guardias (y alguna que otra cerveza posterior) podía ser más divertido de lo que suena. Gracias Alejo por tantos años de enseñanzas y por tu amistad incondicional.

Por supuesto, a mi gran familia. A TODOS, que habéis estado ahí siempre que os he necesitado. Especialmente, a mis padres, grandes “culpables” de todo este proceso, por enseñarme a esforzarme siempre al máximo. Con especial cariño a la parte inglesa, María y sus “angels”, por el gran apoyo ofrecido y la ayuda con el inglés.

A Santi, no solo por tu ayuda con la informática sino por estar siempre a mi lado, acompañándome, alentándome a seguir adelante. Nadie mejor que tú sabe lo que ha supuesto esta tesis para mí (nosotros). Gracias por todo.

Y a todos los que alguna vez habéis preguntado “¿Qué tal van los ratones?”. Amigos, compañeros y, especialmente a “J”, lo feliz que debes estar, allí donde estés, de ver el final de este proyecto.

GRACIAS.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	14
SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	27
1. ANAFILAXIA.....	27
1.1. Modelos murinos de anafilaxia.....	28
2. INFECCIÓN POR PARÁSITOS Y ALERGIA	36
2.1. Clasificación parásitos	36
2.2. El sistema inmune y la infección por parásitos.....	37
2.3. <i>Anisakis simplex</i>	41
2.4. Teoría de la higiene y el equilibrio Th1/Th2.....	44
2.5. Equilibrio Th1/Th17/Th2/Treg	46
2.6. Infección por parásitos y enfermedades alérgicas.....	48
HIPÓTESIS.....	53
OBJETIVOS.....	54
1. OBJETIVOS PRIMARIOS.....	54
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. DESARROLLO DEL MODELO DE ANAFILAXIA Y SELECCIÓN DE LA CEPA.....	55
1.1. Ratones y extractos.....	55
1.2. Protocolo de sensibilización	56
1.3. Demostración de la sensibilización a cacahuete	57
1.4. Valoración de la respuesta anafiláctica	59
1.5. Determinación del perfil de citocinas.....	61
2. SELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE ANAFILAXIA	62

2.1. Protocolo de sensibilización y protocolo de provocación	62
2.2. Valoración de la respuesta anafiláctica	63
3. PREVENCIÓN DE LA ANAFILAXIA CON LOS EXTRACTOS DE <i>ANISAKIS SIMPLEX</i>	64
3.1. Extractos de <i>Anisakis simplex</i>	64
3.2. Pretratamiento con los extractos de <i>Anisakis simplex</i>	65
3.3. Demostración de la sensibilización a cacahuete	66
3.4. Valoración de la respuesta anafiláctica	66
3.5. Determinación del perfil de citocinas.....	67
4. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS.....	67
RESULTADOS	69
1. DESARROLLO DEL MODELO DE ANAFILAXIA Y SELECCIÓN DE LA CEPA.....	69
1.1. Sensibilización al cacahuete.....	69
1.2. Respuesta anafiláctica	73
1.3. Perfil de citocinas	76
2. SELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE ANAFILAXIA	78
2.1. Selección de dosis.....	79
3. PREVENCIÓN DE LA ANAFILAXIA CON LOS EXTRACTOS DE <i>ANISAKIS SIMPLEX</i>	82
3.1. Los extractos de <i>Anisakis simplex</i> inhiben parcialmente la sensibilización al cacahuete.	83
3.2. Los extractos de <i>Anisakis simplex</i> reducen la reacción anafiláctica	86
3.3. Los extractos de <i>Anisakis simplex</i> modifican el perfil de citocinas.....	91
DISCUSIÓN	94
1. NECESIDAD DEL DESARROLLO DEL MODELO DE ANAFILAXIA.....	94
2. DESARROLLO DEL MODELO DE ANAFILAXIA SISTÉMICA	95
2.1. Consideraciones sobre la sensibilización en este modelo	95
2.2. Comparación de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c.....	99
3. SELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE ANAFILAXIA. ELECCIÓN DE LA DOSIS DE ANTÍGENO	102
4. TRATAMIENTOS PARA LA ANAFILAXIA ESTUDIADOS EN MODELOS MURINOS	103
5. INMUNOMODULACIÓN DE LA RESPUESTA ALÉRGICA INDUCIDA POR PARÁSITOS	104

<i>5.1. Infección por parásitos vivos en los modelos murinos de anafilaxia</i>	<i>104</i>
<i>5.2. Tratamiento con antígenos de excreción/secreción en los modelos murinos de alergia.....</i>	<i>107</i>
<i>5.3. Anisakis simplex y modelos murinos de alergia.....</i>	<i>110</i>
<i>5.4. Extracto de Excreción/Secreción como tratamiento en nuestro modelo murino de anafilaxia.....</i>	<i>111</i>
REFERENCIAS	114

Índice de figuras

Figura 1. Vías clásica y alternativa de anafilaxia en el ratón. Modificado de Finkelman (12). Los receptores que activan los mastocitos y macrófagos se muestran en verde mientras que aquellos que inactivan estas células se muestran en rojo.....	30
Figura 2. Respuesta inmune en las infecciones parasitarias producidas en el hombre y sus evolución durante el tiempo de la infección. Modificado de Nutman (60). MAC: Macrófagos; Monos: Monocitos; DC: células dendríticas; Eos: eosinófilos; ILC: células linfoides innatas, NKs: células NK; Baso/MC: Basófilos/mastocitos; TCM: linfocitos T memoria; Teff: linfocitos T efectores.	40
Figura 3. Clasificación de los nematodos. El <i>Anisakis simplex</i> pertenece a la familia de los nematodos, clase <i>rhabdita</i> , orden <i>ascaridida</i> . Modificado de (64).	41
Figura 4. Ciclo vital del <i>Anisakis simplex</i> . Extraído de Baeza (67).	42
Figura 5. Equilibrio Th1/Th17/Th2/Treg. A la izquierda, se muestra el equilibrio entre estos cuatro tipos celulares. A la derecha y arriba, se muestra como el desarrollo de las células inflamatorias Th2 junto con las células Th17 inducen la enfermedad alérgica, mientras que la expansión de células Th2 junto con las Treg induce el desarrollo de una repuesta Th2 asintomática.. Modificado de Orihara y cols. (98).....	48
Figura 6. Protocolo de sensibilización para el desarrollo del modelo de anafilaxia y elección de la cepa más adecuada.....	57
Figura 7. Protocolo de provocación para el desarrollo del modelo de anafilaxia y elección de la cepa más adecuada.....	59
Figura 8. Protocolo de sensibilización para la selección de la dosis antigénica óptima para el modelo.....	63
Figura 9. Protocolo de provocación para la selección de la dosis antigénica óptima para el modelo.....	63
Figura 10. Larvas vivas de <i>A. simplex</i> extraídas de <i>Merluccius merluccius</i> comprado en la pescadería. Las larvas fueron cultivadas en una solución de PBS, gentamicina, vancomicina y glucosa.....	65
Figura 11. Protocolo de sensibilización para la prevención de la anafilaxia con los extractos de <i>Anisakis simplex</i>	66
Figura 12. Protocolo de provocación para la prevención de la anafilaxia con los extractos de <i>Anisakis simplex</i>	67
Figura 13. Niveles séricos de IgG1 específica a cacahuete en los grupos sensibilizados (C3H-AC y BALB-AC) y en los grupos control (C3H-NAC y BALB-	

NAC) durante 6 semanas. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (*p<0,05; **p<0,01).	70
Figura 14. Niveles séricos de IgG2a específica a cacahuete en los grupos sensibilizados (C3H-AC y BALB-AC) y en los grupos control (C3H-NAC y BALB-NAC) durante 6 semanas. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (*p<0,05; **p<0,01).	71
Figura 15. Niveles de IgE específica a cacahuete en los grupos sensibilizados al inicio (Semana 0, S0) y al finalizar el estudio (Semana 6, S6). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (*p<0,05; **p<0,01).	72
Figura 16. Niveles de IgE total sérica en los grupos sensibilizados al inicio (Semana 0; S0) y al finalizar el estudio (Semana 6; S6). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (*p<0,05; **p<0,01).	73
Figura 17. Temperatura corporal en los ratones sensibilizados y en los controles durante 30 minutos y tras la provocación con cacahuete. Se muestran las diferencias significativas entre los grupos sensibilizados de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c (**p<0,01, *** p<0,001).	75
Figura 18. Niveles de histamina plasmática 15 minutos después de la provocación con cacahuete en ratones BALB/c y C3H/HeOuJ sensibilizados a cacahuete. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (**p<0,01).	76
Figura 19. Perfil de citocinas (A: IL-4; B: IL-5; C: IL-13; D: IFN- γ ; E: IL-10; F: IL-12) en grupos sensibilizados de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (*p<0,05; **p<0,01).	78
Figura 20. Representación de la mediana de la puntuación de síntomas en los ratones sensibilizados (AC-250, AC-100 y AC-50) y en los no sensibilizados (NAC).	80
Figura 21. Temperatura corporal en ratones sensibilizados con diferentes dosis de cacahuete (AC-250, AC-100, AC-50) y controles (NAC). Las diferencias estadísticamente significativas que se muestran corresponden a las halladas entre el grupo AC-250 y el AC-100 (*p<0,05; **p<0,01).	82
Figura 22. Niveles de IgG1 específica a cacahuete en los grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y en el grupo control (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (***p<0,001). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.	84
Figura 23. Determinación de IgG2a específica a cacahuete en grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y en el grupo control (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (***p<0,001). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.	85
Figura 24. Niveles de IgE específica en grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y el grupo control (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM	

(**p<0,01); (**p<0,001); (n.s.: no significativo). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados..... 86

Figura 25. Representación de la mediana de la puntuación de síntomas en los ratones sensibilizados (AC, AC+E/S, AC+AK) y en el grupo control (NAC) (*p<0,05); (**p<0,01); (**p<0,001). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados. 87

Figura 26. Temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y en el grupo control (NAC). (*p<0,05); (**p<0,01); (**p<0,001). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados. 89

Figura 27. Niveles de histamina plasmática liberada 15 minutos después de la provocación con cacahuete en ratones sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y no sensibilizados (NAC). Los resultados se expresan como la media ± ESM. (*p<0,05). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados. 90

Figura 28. Citocinas (A: IL-4; B: IL-5; C: IL-13; D: IFN- γ ; E: IL-10) producidas por los esplenocitos estimulados con cacahuete. AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados. 92

Índice de tablas

Tabla I. Clasificación de los parásitos según sus características biológicas, morfológicas y fisiológicas. Extraído de Murray y cols. (54).	36
Tabla II. Características de la respuesta Th2 alérgica frente a la respuesta Th2 inducida en las infecciones por helmintos. Modificada de Fallon y cols (59)..	49
Tabla III. Modelos murinos sobre asma bronquial y prevención del desarrollo de alergia. Modificado de Evans y cols (100).	50
Tabla IV. Modelos murinos sobre asma bronquial y tratamiento de la alergia establecida. Modificado de Evans y cols (100).	51
Tabla V. Modelos murinos sobre la anafilaxia sistémica y la prevención del desarrollo de alergia. Modificado de Evans y cols (100).	52
Tabla VI. Descripción de la puntuación de síntomas anafilácticos (score clínico) descrito por Xu y cols. (131).	60
Tabla VII. Grupos de ratones englobados en el primer estudio.....	69
Tabla VIII. Porcentaje de descenso de la temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los ratones sensibilizados (AC) y los no sensibilizados (NAC).	74
Tabla IX. Niveles de citocinas en los grupos sensibilizados de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c.	77
Tabla X. Grupos de ratones englobados en el segundo estudio.....	79
Tabla XI. Porcentaje de descenso de la temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los ratones que recibieron dosis de cacahuete de 250 µg, 100 µg y 50 µg.	81
Tabla XII. Grupos de ratones englobados en el tercer estudio.....	83
Tabla XIII. Resultado del algoritmo de cluster de las K-medias aplicado a la puntuación de síntomas. Se observa como los individuos son claramente mejor clasificados al comparar el grupo AC frente a AC+E/S.....	88
Tabla XIV. Porcentaje de descenso de la temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los ratones sensibilizados sin tratamiento y los que recibieron tratamiento con extracto somático de <i>A. simplex</i> (AC+AK), extracto de excreción/secreción de <i>A. simplex</i> (AC+E/S)	89

Abreviaturas

MAA: Macrófagos activados alternativamente.

aIL-10R: anticuerpo neutralizador del receptor de la IL-10.

Al(OH)₃: Hidróxido de aluminio.

A. simplex: *Anisakis simplex*.

Ara h2: *Arachis hypogaea* 2.

As-MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos obtenido del *A. simplex*.

BBS: Tampón de borato sódico.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CD: Cúmulo de diferenciación.

ConA: Concanavalina A sepharosa.

CXCL: Ligando de la subfamilia CXC de quimiocinas.

E/S: Extracto de Excreción/Secreción.

ESM: error estándar de la media.

FcεRI: Receptor IgE de alta afinidad.

Fcγ-Fcε: Proteína de fusión bifuncional de una inmunoglobulina humana.

FcγRIIb: Receptor de inhibición IgG.

FcγRIII: Receptor IgG1 de baja afinidad.

FcγRIV: Receptor IgG2a e IgG2b.

HES: Extracto de Excreción/Secreción obtenido de *H. polygyrus*.

HRP: Enzima peroxidada de rábano picante.

ICD: Clasificación internacional de las enfermedades.

IFN-γ: Interferón-gamma.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleucina.

ILC: Células linfoides innatas.

ITAMs: Motivos de activación en inmunoreceptores basados en tirosina.

ITIMs: Motivos de inhibición en inmunoreceptores basados en tirosina.

i.p.: Intraperitoneal.

LPS: Lipopolisacárido.

MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos.

MMCP-1: Proteasa-1 de los mastocitos.

NK: células Natural Killer.

OVA: ovoalbúmina.

PAF: Factor activador plaquetario.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Tampón fosfato.

RELM α : molécula similar a la resistina alfa.

sIg: Inmunoglobulinas específicas.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante.

Th: Linfocitos T helper.

Tl-ES: Antígeno de excreción/secreción de *Toxascaris leonina*.

TLR: Receptores tipo Toll.

Tl-TP: antígeno completo *Toxascaris leonina*.

TMB: Tetrametil bencidina.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TP: Toxina pertussis.

Treg: Linfocitos T reguladores.

Ts E/S: Extracto de excreción/secreción obtenido de *Trichuris suis*.

UA: Unidades Arbitrarias.

Ym1: molécula similar a la quitinasa Chi3L3.

WT: Wild-type.

Resumen

1. Introducción

La anafilaxia es una reacción alérgica aguda, grave y potencialmente mortal cuya incidencia va en aumento en los últimos años en los países industrializados. Debido a su gravedad, no es posible investigar los mecanismos subyacentes en el hombre. Sin embargo, los modelos murinos han supuesto un gran avance en el conocimiento de esta patología gracias a la similitud del sistema inmunológico y los síntomas anafilácticos entre el hombre y el ratón.

El cacahuete es un importante alérgeno alimentario capaz de inducir reacciones graves debido a que sus proteínas son capaces de resistir la digestión gástrica y sus epítomos son capaces de unirse a los linfocitos B y T y de activar la señalización de las células dendríticas y el complemento, induciendo una respuesta alérgica tipo Th2.

Existen distintas cepas de ratón que han sido utilizadas para los estudios de las enfermedades alérgicas cuya respuesta ha demostrado ser diferente según la cepa empleada. Entre ellas, destacan la cepa BALB/c y la cepa C3H/HeO_uJ, cuyos fenotipos alérgicos han permitido avanzar en el conocimiento de estas patologías. Sin embargo, hay pocos estudios que comparen las cepas entre sí. Hasta la fecha, no se han realizado estudios comparativos en estas cepas en un modelo de anafilaxia sistémica inducida por la administración de cacahuete por vía intraperitoneal (i.p.) como el que se describe a continuación por lo que este trabajo se inició con la selección de la cepa a utilizar.

Los parásitos son animales invertebrados capaces de provocar enfermedades en el hombre de forma crónica. Para sobrevivir en el huésped, evolutivamente, han desarrollado mecanismos que les permitan suprimir las respuestas efectoras de éste. Además, el huésped requiere de esta modulación para evitar respuestas inmunes dañinas para el individuo por lo que esta habilidad se ha ensayado en la terapéutica alérgológica.

El *Anisakis simplex* es un parásito helminto capaz de infectar de forma accidental al hombre al ingerir pescado crudo o poco cocinado. El hombre no forma parte del ciclo vital del parásito pero puede desarrollar una respuesta de hipersensibilidad. En este parásito, se han encontrado antígenos somáticos o estructurales que forman parte de la estructura parasitaria y antígenos de excreción/secreción (E/S) que son producto de su actividad fisiológica. Un aspecto característico de estos antígenos es su papel inmunomodulador, exhibiendo un efecto protector en modelos murinos de asma bronquial. Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado estudios de anafilaxia sistémica en los que se administren extractos de *A. simplex* de forma simultánea a la sensibilización antigénica.

2. Hipótesis

En este trabajo gira alrededor de dos hipótesis: A) el desarrollo de modelos murinos de anafilaxia sistémica son instrumentales para el entendimiento de los mecanismos subyacentes en la patología humana y B) las infecciones por parásitos podrían reducir las respuestas alérgicas.

3. Objetivos

3.1. Objetivos primarios

- Desarrollar un modelo murino de anafilaxia sistémica inducida por cacahuete que permita obtener una respuesta clínica e inmunológica potente.
- Analizar los efectos inhibitorios de dos antígenos del *Anisakis simplex* (antígeno somático y excreción/secreción (E/S)) en el modelo murino de anafilaxia.

3.2. Objetivos secundarios

- Comparar la respuesta clínica e inmunológica de dos cepas de ratón (C3H/HeOuJ y BALB/c) empleando el modelo murino de anafilaxia y seleccionar aquella cepa que presente una respuesta anafiláctica clínicamente más evidente.

- Optimizar la dosis de extracto de cacahuete necesario para la sensibilización.
- Analizar los efectos inmunomoduladores de los antígenos del *Anisakis simplex* en la respuesta clínica e inmunológica (humoral y celular).

4. Materiales y métodos

El estudio se ha realizado en 3 fases:

- I. Desarrollo de un modelo de anafilaxia en dos cepas de ratón (C3H/HeOuJ y BALB/c) y selección de aquella con una mejor respuesta clínica o inmunológica. Grupos de ratones de 5 semanas de vida de las cepas BALB/c y C3H/HeOuJ se sensibilizaron por vía i.p. con cacahuete en presencia de adyuvantes. El grupo control recibió dosis equivalentes de solución salina en presencia de adyuvantes. Se midieron en el suero los niveles de inmunoglobulinas específicas a cacahuete (IgG1, IgG2a, IgE) y de IgE total. En la semana 6, todos los ratones fueron provocados mediante la administración i.p. de cacahuete. La anafilaxia se midió a través de la puntuación de síntomas y de los cambios en la temperatura corporal. Tras la provocación sistémica, se midieron la liberación de histamina y la de las citocinas liberadas por los esplenocitos estimulados (IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-10 e IFN- γ).
- II. Búsqueda de dosis que produce una respuesta anafiláctica más potente. Para ello, grupos de ratones de la cepa C3H/HeOuJ se sensibilizaron por vía i.p. con distintas dosis de cacahuete en presencia de adyuvantes. El grupo control recibió dosis equivalentes de solución salina en presencia de adyuvantes. En la semana 6, se estudió la respuesta anafiláctica.
- III. Estudio del efecto inmunomodulador del *Anisakis simplex*, tanto del extracto somático como del de E/S, sobre la anafilaxia en la cepa y dosis más adecuada. Para ello, grupos de ratones de la cepa C3H/HeOuJ fueron sensibilizados por vía i.p. con cacahuete en presencia de adyuvantes. De forma simultánea, un grupo de estos ratones se trató diariamente con extracto somático de *A. simplex*, otro grupo se trató diariamente con extracto de E/S de *A. simplex* y otro grupo se trató con suero salino. Se midieron en el suero los niveles de inmunoglobulinas específicas a cacahuete (IgG1, IgG2a, IgE). A las 5 semanas del inicio del estudio, se realizó una provocación con cacahuete administrado por vía i.p. Tras la

provocación sistémica, se midieron la liberación de histamina y la de las citocinas liberadas por los esplenocitos estimulados (IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-10 e IFN- γ).

5. Resultados

Se presenta el desarrollo de un modelo murino de anafilaxia. En primer lugar se comparó la respuesta anafiláctica de dos cepas de ratón, C3H/HeO_uJ y BALB/c, sensibilizadas a cacahuete. En ambas cepas, la generación de IgG e IgE específica demostró la sensibilización de los ratones. Los ratones C3H/HeO_uJ presentaron niveles significativamente más altos de IgG1 e IgE específica a cacahuete que el grupo de los ratones BALB/c. Tras la provocación con extracto de cacahuete, se objetivaron síntomas anafilácticos, instaurándose más rápida e intensamente en el grupo de ratones C3H/HeO_uJ. La afectación clínica sistémica en este grupo fue mayor que en su homólogo de los BALB/c y se acompañó de un descenso más significativo de la temperatura y de una mayor liberación de histamina plasmática tras la provocación. Aunque ambas cepas desarrollan citocinas Th1, Th2 y Treg, los niveles de estas citocinas fueron muy superiores en el grupo de ratones sensibilizados BALB/c. El patrón encontrado en la respuesta linfocitaria en los ratones BALB/c sugiere una activación mixta Th1 y Th2. Dado que la respuesta clínica fue más evidente en la cepa C3H/HeO_uJ se seleccionó ésta para los estudios siguientes.

A continuación, se compararon distintas dosis de cacahuete para la sensibilización de los ratones C3H/HeO_uJ y se realizó una provocación con el alérgeno. Tras la provocación con cacahuete, se objetivaron síntomas anafilácticos, de aparición más precoz en el grupo de ratones en los que se empleó la dosis de 100 μ g, acompañado de mayor gravedad clínica. Por ello, se estableció esta dosis como la idónea para la continuación del estudio.

En último lugar, se compararon los efectos de los extractos del *Anisakis simplex*, tanto el antígeno somático como el de excreción/secreción, sobre el modelo desarrollado previamente. En ambos casos, la sensibilización desarrollada fue inferior en los grupos que recibieron los extractos del *A. simplex*, encontrando niveles de IgG1 e IgE específica significativamente menores en los grupos

pretratados, sugiriendo una posible protección de la sensibilización en estos grupos. Además, los niveles de IgG2a específica fueron mayores en el grupo que recibió el extracto E/S, lo que mediaría también en el efecto protector de este extracto. Tras la provocación con cacahuete, los ratones que recibieron extractos de *A. simplex* presentaron síntomas anafilácticos de menor intensidad y de inicio más tardío, destacando los leves síntomas clínicos presentados en los ratones que reciben las proteínas secretadas por el parásito. La temperatura corporal permaneció prácticamente estable en estos ratones de forma similar a los ratones no sensibilizados. La escasa liberación de histamina tras la provocación en este grupo, refuerza todos estos datos. Por último, ambos grupos desarrollaron citocinas que demuestran un patrón mixto. Destaca especialmente la inhibición de la IL-5 producido por el pretratamiento con el E/S. Además, el incremento de la citocina Th1, IFN- γ , y reguladora, IL-10, en los ratones que recibieron E/S sugieren una posible modulación de la respuesta alérgica Th2 hacia Th1.

6. Discusión

Se ha creado un modelo de anafilaxia murino en el que se ha investigado el efecto protector de las proteínas parasitarias del *Anisakis simplex*.

En el modelo mostrado, se empleó la vía intraperitoneal como vía de sensibilización y provocación ya que se ha demostrado la necesidad de que los alérgenos sean absorbidos de forma sistémica para inducir una respuesta alérgica clara. Se ha demostrado que los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a desarrollados en el ratón sensibilizado se relacionan con el número de dosis recibidas durante el periodo de sensibilización y que el empleo de 3 dosis induce una respuesta inmune humoral, celular y clínica óptima para este estudio. Los adyuvantes han sido ampliamente utilizados en los modelos murinos de enfermedades alérgicas ya que los antígenos purificados son poco inmunogénicos. En este estudio se ha seleccionado el hidróxido de aluminio por ser un potente adyuvante pro-Th2, con la toxina pertussis, promotor de respuestas Th1 y Th2.

Hay varios estudios que comparan las cepas C3H/HeOuj y BALB/c con resultados dispares. Li y cols. (J Immunol. 1999;162(5):3045) demostraron que los ratones C3H/HeOuj presentaban niveles más elevados de IgG1, pero menores

niveles de IgE específica junto con mayor liberación de citocinas que los BALB/c, mientras que Morafo y cols. (J Allergy Clin Immunol. 2003;111(5):1122) y Smit y cols. (PLoS One. 2011;6(12):e28917) demostraron que la cepa C3H/HeOJ presentaba mayor grado de anafilaxia junto con niveles más elevados de IgE específica. Curiosamente, Morafo y cols. no encontraron síntomas anafilácticos en los ratones BALB/c a pesar de encontrar IgE específica en ellos. Por último, los niveles de citocinas fueron más elevados en la cepa BALB/c en el estudio de Li y cols., mientras que Smit y cols. encontraron niveles más altos en la cepa C3H/HeOJ.

Con respecto a las dosis de antígeno empleada, los datos hallados en la literatura son muy dispares. Por un lado, Chen y cols. (Food Chem Toxicol. 2013;62:41) encontraron que las dosis bajas eran las que inducían una mayor producción de IgE e IgG1 específicas, mientras que para Yamanishi y cols. (Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67(1):166) las dosis más altas tendrían una mayor respuesta alérgica. Por ello, se hace necesario ensayar distintas dosis para elegir la más adecuada. En nuestro caso, fue con la dosis intermedia con la que se obtuvo una mejor respuesta clínica.

La mayoría de los estudios extraídos de la literatura muestran un efecto protector de los parásitos y sus productos para la prevención y el tratamiento del asma bronquial y la anafilaxia en los modelos murinos y que dicha protección se relaciona con los niveles elevados de IL-10. Estudios aislados, como el de Michels y cols. (Infect Immun. 2006;74(10):5926) no hallan dicha protección en su modelo de anafilaxia y demuestran como los ratones infectados por *Syphacia obvelata* presentaban mayor grado de anafilaxia que los no infectados.

Los últimos estudios, se han centrado en el estudio de los antígenos de excreción/secreción de los parásitos demostrando que estos extractos son capaces de proteger frente al desarrollo de asma bronquial tanto de forma sistémica como local. Aunque muchos autores relacionan esta protección con la IL-10, McSorley y cols. (Eur J Immunol. 2012;42(10):2667) postulan que esté relacionada también con la disminución en los macrófagos activados alternativamente.

Por último, Park y cols. (J Immunol. 2009;182(11):6907) emplearon un producto del E/S del *A. simplex* para tratar a ratones sensibilizados. Observaron como el tratamiento con este antígeno fue capaz de proteger frente al asma bronquial y de inmunomodular e inhibir la reacción alérgica Th2 a través de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β .

Basado en estos estudios, se ha desarrollado en este trabajo el tratamiento preventivo de la anafilaxia con los antígenos somáticos y de E/S del *A. simplex*. En el modelo presentado, la administración de E/S de forma simultánea a la sensibilización fue capaz de proteger y evitar la respuesta anafiláctica. Los niveles bajos de IgE e IgG1 sugieren una alteración del desarrollo de la respuesta alérgica desde el inicio de la sensibilización. También, permanecieron bajos los niveles de IL-5 lo que sugiere un papel principal de esta citocina en este modelo. Por último, los niveles elevados de IgG2a e IL-10 demuestran que la inmunomodulación inducida por el E/S de la respuesta alérgica Th2 hacia Th1 ocurre a través de estas rutas.

7. Conclusiones

- Las cepas C3H/HeOuj y BALB/c son ambas idóneas para el estudio de la anafilaxia sistémica, siendo la primera más adecuada para la evaluación de la respuesta clínica, idóneamente con 100 μ g por dosis y 3 dosis de extracto.
- Los antígenos parasitarios del *Anisakis simplex* somáticos y, fundamentalmente, los de excreción/secreción, son capaces de reducir la respuesta anafiláctica.
- Los antígenos de *Anisakis simplex* ejercen un efecto inmunomodulador a nivel humoral y celular.

Summary

1. Introduction

Anaphylaxis is an acute, severe and potentially lethal allergic reaction whose incidence is increasing over the last years in industrialized countries. Due to its severity, there is no possibility to study the underlying mechanisms in humans. Thereby, murine models have posed a great advancement in building the knowledge around this pathology thanks to the similarities observed between immune system and anaphylactic symptoms in both humans and mice.

Peanut is one of the main food allergens and it is responsible for one of the highest incidences of severe food allergic reactions. Peanut's proteins are known to resist digestion, comprise B-cell and T-cell epitopes and activate dendritic cells and complementary pathways, inducing a Th2 allergic response.

There are diverse mice strains that have been used in the study of allergic pathologies and their responses have been variable depending on the strain initially selected. BALB/c and C3H/HeO_uJ strains should be highlighted for their contribution to the advancement of these pathologies thanks to their allergic phenotypes. However, only a limited number of studies compare these two strains. In fact, there are no studies comparing both strains in a systemic anaphylaxis model induced by peanut intraperitoneal (i.p.) administration to date. Hence, selection of the strain to be used became the first step of our research plan.

Parasites are invertebrate animals that may produce chronic diseases in humans. In order to survive in the host, parasites have evolved and developed mechanisms for suppressing host effector responses. Additionally, the host requires this modulation in order to avoid self-harming immune responses. Exploitation of this capability in allergic therapies has already been attempted.

Anisakis simplex is a helminth parasite able to accidentally infest human beings when they eat raw or rare fish. Humans do not participate in the vital cycle of the parasite but they can develop hypersensitivity reactions. This parasite bears

somatic or structural antigens that engage in structural functions and excretion/secretion (E/S) antigens that are products of its physiologic activity. One relevant aspect of these antigens is their role as immunomodulators, showing a protective effect in murine models of bronchial asthma. Nevertheless, no studies on systemic anaphylaxis with simultaneous administration of *A. simplex* extract and antigen sensitization are available to date.

2. Hypothesis

This work is based on two hypotheses: A) murine models of systemic anaphylaxis are instrumentals for understanding the underlying mechanisms in human diseases and B) parasites infections may reduce allergic responses.

3. Objectives

3.1. Primary objectives

- Develop a systemic anaphylaxis murine model induced by peanut that produces a potent clinical and immunologic response.
- Analyze the inhibitory effects of two *Anisakis simplex* antigens (somatic and excretion/secretion (E/S)) in the anaphylaxis murine model.

3.2. Secondary objectives

- Compare clinical and immune responses in two mice strains (C3H/HeOuJ y BALB/c) using the anaphylaxis murine model. Select the strain that presents a more defined clinical anaphylactic response.
- Optimize peanut extract dose necessary for sensitization.
- Analyse immunomodulatory aspects of *Anisakis simplex* antigens in the clinical an immunological responses (humoral and cellular).

4. Materials y methods

The study has been developed in three phases:

- IV. Development of a murine model of anaphylaxis in two mice strains (C3H/HeOuJ y BALB/c) and selection of the strain that shows a more defined clinical and immunological response. Groups of 5-week-old mice from BALB/c and

C3H/HeOuJ strains were sensitized following i.p. administration of peanut plus adjuvants. Control group received equivalent doses of saline solution plus adjuvants. Blood serum was collected for measurement of peanut specific immunoglobulins (IgG1, IgG2a and IgE) and total IgE. At week 6, all mice were challenged by the administration of peanut intraperitoneally. Anaphylaxis was measured through clinical score and changes in body core temperature. After systemic challenge, histamine and cytokines from stimulated spleen cells were measured (IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-10 e IFN- γ).

- V. Determination of dose required to produce a potent anaphylactic response. Groups of mice from the C3H/HeOuJ strain were sensitized following i.p. administration of different peanut doses plus adjuvants. Control group received equivalent doses of saline solution plus adjuvants. Anaphylactic response was then studied at week 6.
- VI. Study of the immunomodulator effect of *Anisakis simplex* antigens, somatic and E/S, in an anaphylaxis model using the strain selected and at the most suitable dose. Groups of mice from the C3H/HeOuJ strain were sensitized by peanut i.p. administration plus adjuvants. Simultaneously, a group of these mice were daily treated with *A. simplex* somatic extract, a second group was daily treated with *A. simplex* E/S extract and a control group was treated with saline solution. Blood serum was collected for quantification of peanut specific immunoglobulins (IgG1, IgG2a, IgE). At week 5, all mice were challenged with peanut administrated intraperitoneally. After systemic challenge, histamine and cytokine from stimulated spleen cells were measured (IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-10 e IFN- γ).

5. Results

Development of a murine model of anaphylaxis is shown. First of all, anaphylactic response of two peanut sensitized mice strains, C3H/HeOuJ and BALB/c, were compared. In both strains, specific IgG and IgE responses showed that mice were peanut sensitized. C3H/HeOuJ mice exhibited significantly higher specific IgG1 and IgE than BALB/c mice. After peanut challenge, anaphylactic symptoms were observed, those being faster and more intense in C3H/HeOuJ mice. Systemic clinical response in this group was more severe and shared a more

significant decrease in body temperature and higher histamine release after peanut challenge than BALB/c mice. Conversely, although both strains developed Th1, Th2 and Treg cytokines, higher levels of these cytokines were found in BALB/c sensitized group. Lymphocytic pattern response in BALB/c mice suggests a Th1 and Th1 mixed activation. Due to a more pronounced clinical response observed in C3H/HeOuJ mice, this strain was selected for further studies.

Next, comparison of different peanut doses needed for C3H/HeOuJ sensitization was carried out. After peanut challenge, anaphylaxis response was then observed. This response happened earlier and was more severe in those mice receiving a 100 µg dose. For that reason, this dose was established as the suitable dose for the subsequent studies.

Finally, somatic and E/S *A. simplex* effects were compared in the murine model previously developed. In both cases, lower sensitization was observed in the groups receiving *A. simplex* extracts. Significant lower levels of specific IgG and IgE were found in the pretreated groups, suggesting a feasible protection by sensitization in those groups. Besides, specific IgG2a levels were higher in the group that received E/S extract, which suggests a potential link in the protective effect caused by this extract. After peanut challenge, mice receiving *A. simplex* extracts showed milder and delayed onset of anaphylactic symptoms, this milder effect being particularly remarkable for mice treated with parasite secreted proteins. Core body temperature remained almost stable in this group, in a similar behaviour to the non-sensitized mice group. Scarce release of histamine after peanut challenge in this groups, strengthen all these data. Finally, both groups released cytokines, showing a mix pattern. Particularly remarkable was the inhibition of IL-5 induced by E/S pretreatment. Additionally, an increase in Th1, IFN-γ, and regulatory cytokine, IL-10, in mice receiving E/S suggests a feasible modulation of allergic response from Th2 to Th1.

6. Discussion

A murine model of anaphylaxis has been developed. The protective effect of *A. simplex* parasite proteins has been studied.

In the model described, intraperitoneal route was used for sensitization and challenge because it has been demonstrated that allergens must be systemically absorbed for inducing a clear anaphylactic response. Levels of IgE, IgG1 and IgG2a developed in sensitized mice correlated well with the number of doses received during sensitization. The utilization of 3 doses was considered optimal in terms of the humoral, cellular and clinical response necessary for this study. Adjuvants have been widely used in allergic murine models because purified antigens are poorly immunogenic. In this study, aluminium hydroxide was selected because it is a potent pro-Th2 adjuvant, in conjunction with pertussis toxin, which promotes both Th1 and Th2 responses.

There are some studies comparing C3H/HeOuj y BALB/c strains but they showed different results. Li *et al.* (J Immunol. 1999;162(5):3045) showed that C3H/HeSn mice exhibited higher specific IgG1 levels but lower specific IgE levels with a higher release of cytokines than BALB/c, both sensitized to peanut Morafo *et al.* (J Allergy Clin Immunol. 2003;111(5):1122) and Smit *et al.* (PLoS One. 2011;6(12):e28917) showed that C3H/HeOuj exhibited higher anaphylaxis degree with higher specific IgE levels. Curiously, Morafo *et al.* showed that BALB/c mice were not able to develop an anaphylactic response, even if they exhibited specific IgE levels. Finally, cytokines levels were higher in BALB/c mice in Li *et al.* study, whereas Smit *et al.* found that higher cytokines levels were observed in C3H/HeOuj group.

Regarding antigen doses used, data found in the literature are variable. On one hand, Chen *et al.* (Food Chem Toxicol. 2013;62:41) found that lower doses induced a higher specific IgE and IgG production. On the other hand, Yamanishi *et al.* (Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67(1):166) found that higher doses triggered a stronger allergic response. Because of this variability, there is a need to test different doses in order to select the most suitable one. In our study, intermediate dose showed a stronger clinical response.

The majority of studies found in literature, show a protective effect of parasites and their products in the prevention and treatment of bronchial asthma and anaphylaxis in murine models. These studies relate the observed protective effect with higher levels of IL-10. Particular studies, like the one of Michels *et al.* (Infect

Immun. 2006;74(10):5926) did not showed the protective effect of helminths in their model of anaphylaxis. On the contrary, it has been reported that mice infested with *Syphacia obvelata* developed a more severe anaphylactic response than non-infected mice.

More recent studies have been focussed on the exploration of parasite excretion/secretion antigens. In these studies, extracts were able to protect from bronchial asthma, both locally and systemically. Although many authors related this protection with IL-10, McSorley *et al.* (Eur J Immunol. 2012;42(10):2667) also suggested that it might be related to a decrease in alternative activated macrophages.

Finally, Park *et al.* (J Immunol. 2009;182(11):6907) used *A. simplex* E/S products for treating sensitized mice. The authors showed how treatment with this antigen was able to protect from bronchial asthma and inhibited Th2 allergic response through regulatory cytokines, IL-10 and TGF- β .

Based on these studies, a preventive treatment of anaphylaxis with *A. simplex* somatic and E/S antigens has been developed. In the model presented, administration of E/S antigen simultaneously with sensitization was able to protect and avoid anaphylactic response. Low levels of IgE and IgG1 suggest an alteration in the development of allergic response from the very beginning of sensitization. In addition, IL-5 levels remained low, suggesting a key role for this cytokine in this model. Finally, high levels of IgG2a and IL-10 also suggest that immunomodulation induced by E/S extract changed the allergic response from Th2 to Th1.

7. Conclusions

- C3H/HeOuJ y BALB/c strains are both suitable for studying systemic anaphylaxis. C3H/HeOuJ was the most suitable strain for evaluating clinical response, especially at 100 μ g per dose, with 3 extract doses.
- Somatic parasite antigens from *Anisakis simplex* and, particularly, excretion/secretion antigens can prevent anaphylaxis.
- *Anisakis simplex* antigens show an immunomodulatory effect at the humoral and cellular levels.

Introducción

1. Anafilaxia

La anafilaxia es una reacción alérgica aguda, grave, con compromiso vital y potencialmente mortal (1), descrita por primera vez por Richet en 1904 (2). Su incidencia se cree que está infraestimada debido a la ausencia de una codificación correcta en la clasificación internacional de las enfermedades (ICD) y a que, en muchas ocasiones, los síntomas son autolimitados (1). Se estima que del 0,05 al 2% de la población mundial sufrirá algún episodio de anafilaxia a lo largo de su vida y dicha incidencia va en aumento (3). En Europa, la incidencia es de 1,5 a 7,9 casos por cada 100.000 personas al año, habiéndose observado un incremento de los ingresos en Urgencias por esta causa aunque, afortunadamente, la tasa de mortalidad se encuentra por debajo del 0,001% (4).

La anafilaxia se caracteriza por la aparición brusca de varios síntomas y signos dentro de las dos horas posteriores a la exposición al alérgeno. Se produce un compromiso de la vía aérea y/o problemas cardiovasculares que, habitualmente pero no siempre, se acompañan de síntomas en piel y mucosas (1, 4). El tratamiento de elección de la anafilaxia es la administración intramuscular de adrenalina a dosis de 0,01 ml/kg de peso hasta una dosis máxima de 0,5 ml, que puede repetirse a los 5 minutos, en caso necesario. La segunda línea de tratamiento incluye la retirada del alérgeno responsable, colocar al paciente en una posición correcta, la administración de oxígeno a alto flujo, agonistas beta-2 de acción corta, reposición de líquidos por medio de cristaloides y la administración de adrenalina nebulizada. Por último, las guías europeas recomiendan el uso de

antihistamínicos y glucocorticoides (1). Todos los pacientes que sufren un episodio de anafilaxia deben ser estudiados en un servicio de Alergia para identificar el alérgeno responsable y poder así evitarlo (5). Sin embargo, estos pacientes están permanentemente en riesgo de sufrir un nuevo episodio de anafilaxia si entran en contacto de forma inadvertida con el alérgeno.

Debido a la gravedad de las reacciones y a la necesidad de conocer los mecanismos responsables de esta patología para innovar en nuevas terapias efectivas, es necesario ampliar los estudios en este campo. Sin embargo, el estudio de los mecanismos inmunológicos subyacentes en el hombre es bastante complejo (6, 7). Gracias a la similitud del sistema inmunológico entre el hombre y el ratón y al desarrollo de cepas modificadas genéticamente, se han desarrollado con éxito modelos murinos de anafilaxia que han supuesto un gran avance en el conocimiento de esta patología, permitiendo elucidar los mecanismos responsables así como buscar nuevos tratamientos (8, 9). Por ello, estos modelos murinos son cada vez más empleados (10).

1.1. Modelos murinos de anafilaxia

Estos estudios se iniciaron en 1941 (11). Desde entonces, las diferentes cepas de ratón empleadas en los modelos han permitido conocer mecanismos importantes de las vías de la anafilaxia que, posteriormente, han sido corroborados en el hombre.

1.1.1. Respuesta anafiláctica sistémica en los modelos murinos

Se han descrito dos mecanismos independientes para explicar las reacciones anafilácticas sistémicas en el ratón: la vía clásica y la vía alternativa (12). La vía clásica es mediada por la inmunoglobulina E que se encuentra unida al receptor

IgE de alta afinidad (FcεRI) presente en los mastocitos y basófilos. El reconocimiento de un alérgeno a través de moléculas de IgE adyacentes, induce la agregación de los FcεRI, activando así los mastocitos y basófilos. Al activarse, se induce una rápida liberación de histamina, proteasa-1 de los mastocitos (MMCP-1) y factor activador plaquetario (PAF). A continuación, se produce una vasodilatación, un aumento de la permeabilidad vascular, un aumento de la contractilidad muscular cardíaca, y una caída de la temperatura corporal (13).

La vía alternativa es mediada por la inmunoglobulina G1 (IgG1), producida durante el periodo de sensibilización (14). La IgG1 se une al receptor IgG1 de baja afinidad, FcγRIII, localizado en los macrófagos y basófilos. Esta activación, induce la liberación de PAF (15). De la misma forma que la vía clásica, en esta vía se llegaría a inducir una vasodilatación, un aumento de la permeabilidad vascular y una disminución de la temperatura corporal. Sin embargo, la liberación de PAF induce una disminución de la función miocárdica (13).

La estimulación de mastocitos y macrófagos se lleva a cabo a través de receptores FcRs con motivos de activación en inmunoreceptores basados en tirosina (ITAMs) localizados en el dominio intracitoplasmático de éstos. La supresión de estas vías se lleva a cabo, entre otros, por otros receptores celulares con ITIMs (motivos de inhibición en inmunoreceptores basados en tirosina) (12) (Figura 1).

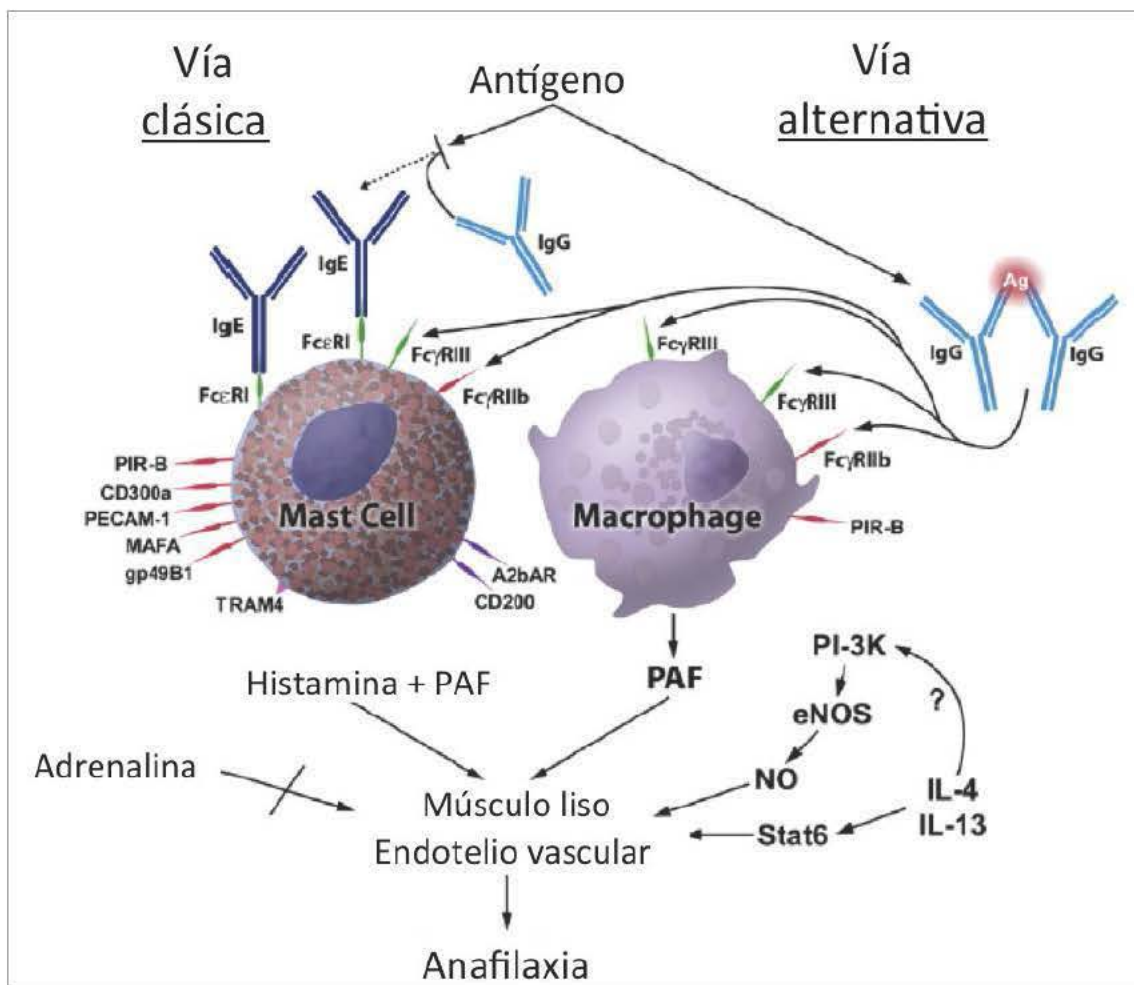


Figura 1. Vías clásica y alternativa de anafilaxia en el ratón. Modificado de Finkelman (12). Los receptores que activan los mastocitos y macrófagos se muestran en verde mientras que aquellos que inactivan estas células se muestran en rojo.

Otros autores han descrito niveles elevados de IgE e IgG específicas a cacahuete en modelos de anafilaxia, lo que supondría la activación de ambas vías de la anafilaxia (15, 16). Se postula que al administrar el antígeno por vía parenteral y alcanzar dosis elevadas en el torrente sanguíneo, se excede la capacidad de la IgG1 de bloquear la unión del antígeno con la IgE-mastocito y desarrollándose así una anafilaxia sistémica mediada por IgG1 e IgE. Por otro lado, la administración del antígeno por vía oral o las bajas dosis recibidas por vía parental se relacionan más

frecuentemente con la activación casi exclusiva de los mastocitos a través de la IgE (17).

Por otro lado, la IgG1 es capaz de bloquear la anafilaxia dependiente de IgE bien interfiriendo con el antígeno antes de que induzca la activación mastocitaria a través del sobrecruzamiento en el FcεRI o bien a través de la formación de inmunocomplejos IgG-antígeno-IgG que induciría una señal inhibitoria a través de su unión con el receptor inhibidor FcγRIIb (receptor IgG que contiene ITIM) (18).

Se han descrito diferencias notables entre cepas en este campo. Smit y cols (19) en su modelo de anafilaxia inducida por cacahuete observan un mayor descenso de la temperatura corporal en los ratones C3H/HeO_uJ al reducir el número de plaquetas, comparado con la cepa BALB/c, lo que sugiere que parte de la activación de la vía alternativa es dependiente de las plaquetas. De esta forma, postulan que la activación de los mastocitos induciría la liberación de histamina y PAF activándose a continuación los monocitos y macrófagos, liberándose mayor cantidad de PAF lo que activaría las plaquetas. En otras cepas, como por ejemplo los ratones C3H/HeSn (20) y C57BL/6 (19), también se describe la participación de la vía alternativa.

Arumugam y cols. (21) observan una gran variabilidad en el número de mastocitos en los tejidos de las diferentes cepas. En su caso, los mastocitos tisulares de los ratones 129S5 presentan, con respecto a los ratones BALB/c, un aumento de la capacidad proliferativa y una disminución de la frecuencia de apoptosis junto con una mayor sensibilidad a la histamina plasmática. Dado que la histamina produce un efecto vasodilatador, se induciría un mayor descenso de la

temperatura corporal al desencadenarse una reacción IgE mediada en esta cepa de ratón.

Así, la predisposición genética presente en las distintas cepas tendrá una repercusión importante en la activación de las diferentes vías que inducen la respuesta anafiláctica. De ello se deduce que la elección de la cepa adecuada será crucial para la obtención del modelo de anafilaxia más conveniente.

Por otro lado, se ha descrito como la IgG2a puede actuar como un anticuerpo bloqueante y antagonizar de forma efectiva la respuesta alérgica. Tanto en los ratones tratados con inmunoterapia específica como en el hombre, se detectan niveles elevados de IgG2a e IgG4, respectivamente (22, 23). En el hombre, los niveles elevados de IgG4 se han asociado además con la mejoría clínica en los pacientes que reciben inmunoterapia subcutánea (24). En los ratones, el tratamiento con inmunoterapia específica induce una elevación de los niveles de IgG2a que se correlacionan de forma inversa con una disminución de la hiperreactividad bronquial (25). Se ha descrito como los anticuerpos IgG2a pueden interferir con la liberación de mediadores por parte de los mastocitos y basófilos mediada por IgE e inhibir la formación de inmunocomplejos desencadenados por otras IgGs (26), protegiendo así de la reacción anafiláctica.

1.1.2. Cepas murinas en anafilaxia

Tradicionalmente, se ha utilizado la cepa BALB/c para caracterizar el fenotipo alérgico y, a través de esta cepa, se han podido describir las diferentes vías de la anafilaxia en el ratón (12, 15). Además, esta cepa ha permitido estudiar los efectos de tratamientos como las vacunas multivalentes (que contienen alérgenos dispares provenientes de alimentos, ácaros, epitelios, pólenes, y veneno de avispa) que

evitan la sensibilización y protegen de la anafilaxia y que, potencialmente, podrían ser aplicables en el hombre (27). También, la cepa BALB/c ha permitido conocer parte de las diferencias en los mecanismos observados entre la sensibilización alérgica y la tolerancia oral, lo que podría permitir conocer los mecanismos reguladores y evitar la sensibilización alérgica en los niños (28).

La cepa 129SvEvBrd ha demostrado una mayor sensibilidad a la histamina y la presencia de un mayor número de mastocitos en los tejidos, por lo que es más susceptible a la anafilaxia mediada por IgE y los mastocitos. Así, el uso de esta cepa permitiría estudiar en profundidad la anafilaxia mediada por IgE y la biología de los mastocitos en este tipo de reacciones alérgicas (21).

Una tercera cepa, la cepa C57BL/6, se ha utilizado para generar ratones transgénicos (*"knockout"*). Con ella, se ha establecido la participación de las inmunoglobulinas específicas y los mastocitos funcionales en la anafilaxia sistémica (29), y la implicación del Receptor de IgG2a e IgG2b (FcγRIV), los neutrófilos y el factor activador de plaquetas (PAF) en la anafilaxia tanto activa como pasiva (30).

Por último, otra cepa que ha permitido conocer la contribución de la IgE específica, la liberación de histamina y la desgranulación mastocitaria en la anafilaxia sistémica es la C3H/HeJ (31). Los síntomas clínicos observados en esta cepa en los modelos que se han generado de anafilaxia se asemejan a los aparecidos en el hombre por lo que posteriormente ha sido empleada para estudiar tratamientos, como es el caso de la fórmula de hierbas chinas que ha demostrado ser útil para bloquear las reacciones anafilácticas (32). Las infecciones

por helmintos también han demostrado protección frente al desarrollo de la sensibilización alérgica (33, 34).

Finalmente, los ratones transgénicos se han empleado para demostrar la inhibición de la desgranulación de los mastocitos y basófilos a través de los receptores FcεRI por medio de una proteína de fusión bifuncional de una inmunoglobulina humana Fcγ-Fcε que podría terminar en un tratamiento de inmunoterapia (35).

Sin embargo, no todas las cepas son adecuadas para el estudio de la anafilaxia. Por ejemplo, las cepas AKR/J y la CBA/J, empleadas extensamente en estudios de alergia respiratoria (36, 37), han demostrado no ser adecuadas para la inducción de la alergia alimentaria (20, 38).

De esta forma, aunque todos los modelos murinos han sido validados, cada estudio requiere una cepa concreta para obtener la respuesta clínica e inmunológica más satisfactoria. Sin embargo, hay pocos estudios que comparen las características específicas de las cepas de ratón, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos entre los diferentes estudios. En este sentido, son pocos los estudios en los que se comparan las características de las cepas BALB/c y C3H/HeOuj y, hasta la fecha, nunca se ha descrito en un modelo de anafilaxia sistémica inducida mediante la administración del alérgeno por vía intraperitoneal. En este estudio y basándonos en datos previos de nuestro grupo (39), inicialmente se ha querido comparar dos cepas diferentes en cuanto a la respuesta clínica e inmunológica para seleccionar la más adecuada para el estudio de protección con antígenos del *Anisakis simplex*.

1.1.3. Modelos murinos de anafilaxia. Uso de cacahuete como antígeno

La alergia al cacahuete tiene unas características propias. En primer lugar, es una de las alergias alimentarias más frecuentes, de inicio en la primera infancia y que no suele resolverse de forma espontánea con los años (40). Es la principal causa de muerte por reacciones alérgicas con alérgenos alimentarios (41). Actualmente, se estima que afecta al 2% de los niños que viven en países industrializados y su incidencia está en aumento (42). En los últimos años, se han realizado varios estudios que podrán suponer grandes cambios en el diagnóstico de la alergia al cacahuete mediante el test de activación de basófilos (43), en su tratamiento mediante protocolos de inmunoterapia oral (44) e incluso en su prevención mediante la administración de cacahuete de forma temprana (45).

Se han descrito características propias del cacahuete como alérgeno: por un lado, tienen gran cantidad de proteínas cuyos epítopos se unen a los linfocitos B y T desencadenando una respuesta alérgica IgE mediada (46, 47). Además, estas proteínas son capaces de resistir la digestión gástrica (46), lo que se relaciona con su capacidad de desencadenar reacciones alérgicas graves. El alérgeno mayoritario Ara h1 es capaz de activar las células dendríticas de tal forma que éstas inducen una respuesta Th2 (48).

Por otro lado, Khodoun y cols. (49) a través de ratones transgénicos, han descrito como el cacahuete es capaz de inducir un shock anafiláctico activando directamente la vía del complemento y la desgranulación mastocitaria al mismo tiempo.

Dada la gran potencia y estabilidad, el cacahuete se ha utilizado ampliamente en los modelos de anafilaxia (19, 20, 29, 31-33, 38, 49-53).

2. Infección por parásitos y alergia

Los parásitos son animales invertebrados capaces de provocar enfermedades en el hombre y en otros animales. Las infecciones por parásitos se adquieren habitualmente de fuentes exógenas y los parásitos penetran por vía oral, a través de la piel o a través de las picaduras de artrópodos vectores. La transmisión de estas enfermedades se facilita por la contaminación del entorno con desechos de animales y humanos. Las parasitosis son, con frecuencia, crónicas pudiendo prolongarse durante meses o años (54).

2.1. Clasificación parásitos

Según sus características biológicas, morfológicas y fisiológicas, los parásitos patógenos para el hombre se han clasificado en protozoos, hongos, helmintos y artrópodos. A su vez, los helmintos se dividen en platelmintos (trematodos y cestodos) y nematodos (Tabla I).

Clasificación de los parásitos patógenos		
Protozoos	Ameba	
	Flagelados	
	Ciliados	
	Esporozoos	
Hongos	Microsporidios	
Helmintos	Platelmintos	Nematodos
		Cestodos
Artrópodos	Nematodos	
	Miriápodos	
	Pentastomida	
	Crustáceos	
	Arácnidos	
	Insectos	

Tabla I. Clasificación de los parásitos según sus características biológicas, morfológicas y fisiológicas. Extraído de Murray y cols. (54).

Los helmintos son unos microorganismos pluricelulares complejos que tienen forma alargada y simetría bilateral. Su tamaño es mucho mayor que el de los

parásitos protozoarios y habitualmente son macroscópicos, con un tamaño que oscila entre 1 mm a 1 cm o más. Los helmintos poseen con frecuencia unas elaboradas estructuras de fijación localizadas generalmente en la región anterior, como pueden ser ganchos, ventosas, dientes o placas. Poseen también un sistema excretor y nervioso primitivos. Los helmintos se subdividen a su vez en platelmintos y nematodos. Los primeros presentan cuerpo aplanado mientras que los segundos presentan cuerpos cilíndricos. Los platelmintos engloban los nematodos y los cestodos (54).

2.2. El sistema inmune y la infección por parásitos

2.2.1. Respuesta inmune inducida por los parásitos en el huésped

Los parásitos se caracterizan por su habilidad para mantener una infección crónica en los huéspedes. Para ello, deben modular la respuesta inmune del huésped de forma que o bien se supriman las respuestas efectoras desarrolladas para eliminar al parásito o bien éstas sean ineficaces, prolongándose así su supervivencia. Esta inmunomodulación es necesaria para evitar la aparición de respuestas inmunes contra el parásito y, por otra parte, para evitar que esta reacción dañe al propio huésped.

Las respuestas inmunes que inducen los helmintos en el hombre, aunque puede variar entre las distintas especies de parásitos, presenta características comunes. Se produce un primado y expansión de linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que inducen la producción de IgE antígeno-específica y la activación de eosinófilos. La inducción de esta respuesta Th2 en el huésped pretende aislar y matar al parásito (55). Por el contrario, la inducción de respuestas Th1/Th17 en el huésped no protege frente a la infección parasitaria y

se relacionan directamente con la aparición de síntomas clínicos graves y potencialmente mortales (56).

La modulación de los helmintos actúa a distintos niveles: por un lado, en el sistema inmune innato, alterando la función de las células dendríticas, células linfoides innatas (ILC) y macrófagos; por otro, en el sistema inmune adaptativo donde los helmintos inducen la expansión de linfocitos T y B reguladores (Tregs y Bregs, respectivamente) produciéndose una hiporrespuesta de los linfocitos T efectores (57-61).

En las células dendríticas, los helmintos son capaces de alterar su maduración y disminuir su capacidad de responder frente a otros procesos infecciosos, como la infección por *Micobacterium tuberculosis*, por ejemplo (62), o incluso de inducir su apoptosis (57). En estudios realizados con las ILC tipo 2, se ha observado como los productos secretados por algunos parásitos (por ejemplo, *H. polygyrus*) inducen un bloqueo de la producción de IL-33 lo que dificulta la activación de las ILC tipo 2 (58). En muchos de los estudios desarrollados en pacientes con filariasis, se observa también que la presencia de IL-4 e IL-13 induce la activación de los macrófagos activados alternativamente (MAA) (59). Los MAA tienen una acción fundamentalmente reguladora ya que son capaces de liberar IL-10 y TGF- β e interfieren con la activación de los linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicas. La supervivencia de los helmintos en el huésped se ha relacionado directamente con la activación de los linfocitos T reguladores (Treg) en el huésped las cuales, a través de la liberación de IL-10 y TGF- β , reducen fuertemente la respuesta inmune frente al parásito (60). Por último, en los linfocitos B la presencia de IL-10 y TGF- β induce un cambio de isotipo de las inmunoglobulinas a IgG4 (incapaz de unirse a

los receptores de basófilos, mastocitos y eosinófilos) y la producción de más IL-10 (61). Con ello, se disminuye la respuesta efectora de los linfocitos T, lo que se conoce como *“hiporrespuesta de los linfocitos T efectores”* (60). A esta hiporrespuesta se suma la inhibición de las células dendríticas descrita previamente, ya que al alterarse la maduración de las células dendríticas se induce una activación subóptima de los linfocitos T CD4⁺ (60). Por otra parte, hay un mayor número de linfocitos T circulantes que expresan el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), importante inhibidor de la señalización en los linfocitos T efectores) (61), participando así de esta hiporrespuesta.

Se ha observado que las personas portadoras de parásitos durante muchos años y clínicamente asintomáticos (tolerantes inmunológicamente hablando) presentan un perfil Th2 modificado en el que se encuentran niveles de IL-5 disminuidos pero sin cambios en los niveles de IL-4 (58) junto con una expresión máxima de IgG4 (61).

De forma cronológica, los cambios inmunológicos observados en el huésped son los siguientes: los helmintos pueden acceder al huésped a través de la barrera cutánea activando las células linfoides innatas (ILC), los macrófagos, las células dendríticas, las células NK, los eosinófilos y los basófilos/mastocitos. A continuación, se induce la diferenciación de los linfocitos T CD4 naïve hacia linfocitos Th1, Th17 y Th2. Coincidiendo con la puesta de huevos del parásito, se produce una expansión de los linfocitos Th2 y una disminución de las células Th1, lo que es absolutamente necesario para el huésped ya que en caso contrario se produciría una enfermedad letal (63). Durante la infección crónica, se produce una expansión de los Treg productores de IL-10 y TGF- β que inhiben la activación de

los macrófagos y suprimen la función de los linfocitos T memoria y T efectores (Figura 2) (60).

Estas propiedades inmunológicas de los parásitos se han utilizado ampliamente para el tratamiento y prevención de procesos inmunológicos, en concreto, reacciones alérgicas.

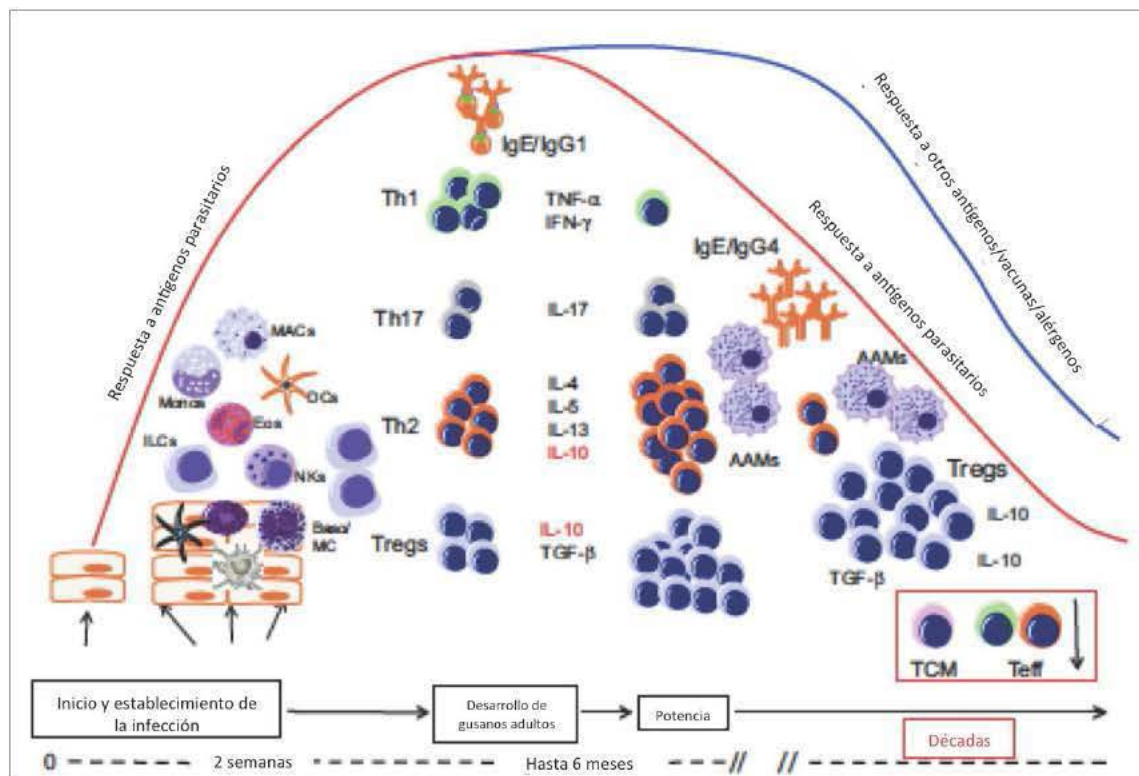


Figura 2. Respuesta inmune en las infecciones parasitarias producidas en el hombre y sus evolución durante el tiempo de la infección. Modificado de Nutman (60). MAC: Macrófagos; Monos: Monocitos; DC: células dendríticas; Eos: eosinófilos; ILC: células linfoides innatas, NKs: células NK; Baso/MC: Basófilos/mastocitos; TCM: linfocitos T memoria; Teff: linfocitos T efectores.

2.3. *Anisakis simplex*

2.3.1. Clasificación *A. simplex*

El *A. simplex* es un parásito helminto que pertenece a la familia de los nematodos, clase *rhabditae*, orden *ascaridida* (Figura 3) capaz de infectar a los pescados y a los invertebrados, incluyendo los moluscos y los crustáceos.

Phylum Nematoda

Clase Aphasmida

Orden Dioctophymatida

Familia Dioctophymatidae: *Dioctophyme renale*

Familia Eustrongylidae: *Eustrongylides tubifex*

Orden Trichurida

Familia Capillaridae { *Capillaria hepatica*
Capillaria philippinensis

Familia Trichinellidae: *Trichinella spiralis*

Familia Trichuridae: *Trichuris spp.*

Clase Rhabditae

Orden Rhabditidae

Strongyloides stercoralis

Orden Strongylida

Familia Ancylostomidae { *Ancylostoma spp.*
Necator americanus
Placoconus spp.

Familia Angiostrongylidae: *Angiostrongylus cantonensis*

Familia Trichostongyloidae { *Cooperia spp.*
Haemonchus spp.
Nematodirus spp.
Obeliscoides cuniculi
Ostertagia spp.
Trichostongylus spp.

Clase Rhabditae (cont.)

Orden Ascaridida

{ *Ascaris spp.*
Toxocara canis
Baylisascaris procyonis
Anisakis spp.

Orden Oxyurida

{ *Enterobius vermicularis*
Cosmocerca sp.

Orden Spirurida

Suborden Spirurina

Familia Onchocercidae

{ *Brugia malayi*
Dirofilaria immitis
Loa loa
Onchocerca volvulus
Wuchereria bancrofti

Familia Rhabdochonidae: *Spinitectus sp.*

Suborden Camallanina

Familia Camallanidae: *Camallanus oxycephalus*

Familia Dracunculidae

{ *Dracunculus medinensis*
Philometra cylindracea

Figura 3. Clasificación de los nematodos. El *Anisakis simplex* pertenece a la familia de los nematodos, clase *rhabditae*, orden *ascaridida*. Modificado de (64).

2.3.2. Ciclo vital de *A. simplex*

El huésped primario del *A. simplex* son los cetáceos (las ballenas y los delfines). Éstos liberan huevos al mar a través de sus heces. Dentro de ese huevo liberado, se produce el cambio del estadio de la larva de L1 a L2, liberándose larvas vivas en estadio L2 que son ingeridas por crustáceos como el krill (primeros huéspedes

intermedios). En ellos, la larva alcanza su estadio L3. Estos crustáceos son ingeridos, a su vez, por otros peces, otros crustáceos más grandes o por cefalópodos (segundos huéspedes intermedios). Dentro de éstos, la larva se encapsula en la superficie de órganos y músculos. Estos huéspedes intermedios pueden ser ingeridos por los cetáceos o por el hombre. En el primer caso, al ser ingeridos por los cetáceos, se transfieren las larvas en estadio L3 que se transforman en larvas estadio L4, L5 y, finalmente, en adultos, capaces de liberar de nuevo huevos, completándose así el ciclo vital. En el segundo caso, el hombre, al comer estos pescados o mariscos que contienen larvas en estadio L3, se convierte en huésped accidental. En él, la larva no puede completar su ciclo vital (Figura 4) (65, 66).

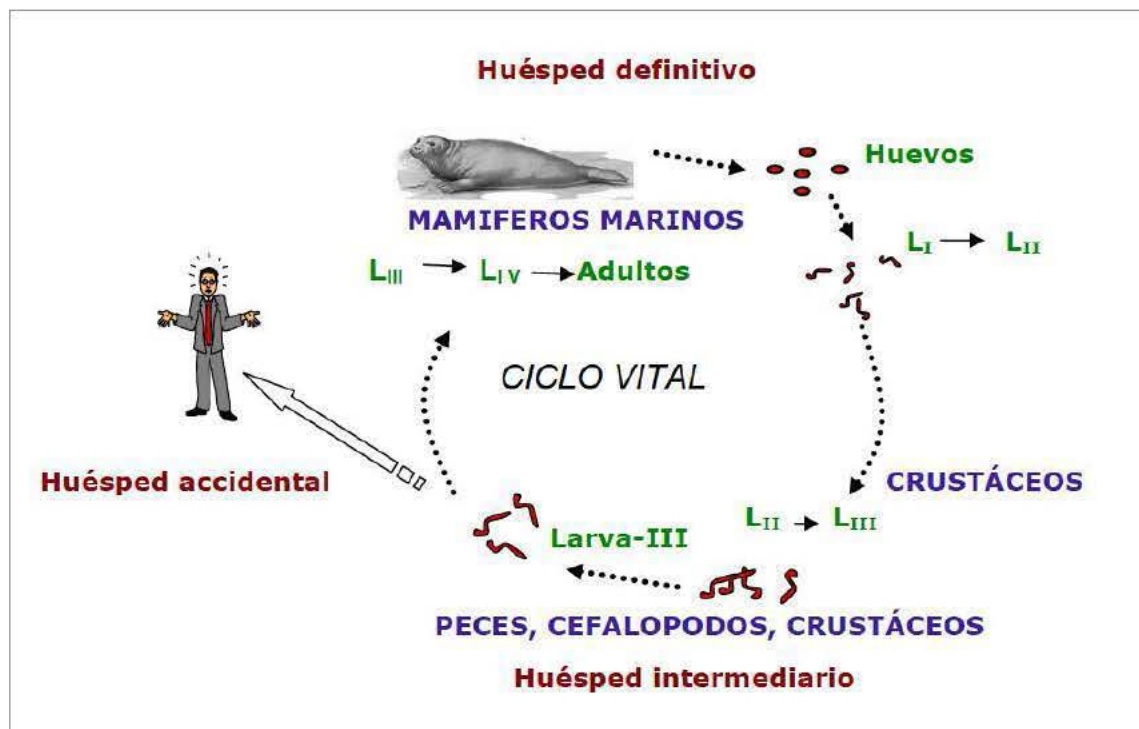


Figura 4. Ciclo vital del *Anisakis simplex*. Extraído de Baeza (67).

2.3.3. Enfermedades producidas por *A. simplex* en el hombre

La ingesta de pescado crudo o poco cocinado que contenga larvas de *Anisakis simplex* en estadio L3 puede dar a enfermedades en el hombre. La primera referencia del término “anisakiasis” (enfermedad provocada por el *A. simplex*) fue realizada por Van en 1962 (68). La incidencia de estas patologías es muy extensa habiéndose diagnosticado más de 20.000 casos en todo el mundo y asociándose de forma estrecha al consumo de pescado crudo. Por ello, es más frecuente en Japón donde, actualmente, se diagnostican entre 2.000 y 3.000 casos al año (69, 70), seguido de Europa y algunos países de África y América del Sur (71).

En el hombre, las larvas pueden penetrar en la mucosa gástrica, produciéndose una “anisakiasis gástrica aguda” (71). En ésta, se presentan síntomas gastrointestinales agudos (dolor abdominal, vómitos, diarrea) sin asociar síntomas alérgicos y su tratamiento debe incluir en muchos casos la retirada de la larva por medio de una endoscopia. Por otro lado, se pueden desencadenar una “anisakiasis gastroalérgica” (72) en la que aparecen síntomas alérgicos (desde la urticaria o el angioedema hasta la anafilaxia) sin asociar síntomas gastrointestinales o siendo éstos muy leves. Dichos síntomas alérgicos pueden aparecer hasta días después de la ingesta del pescado (73). Su tratamiento incluye el requerido para tratar las reacciones alérgicas sin ser necesaria, habitualmente, la endoscopia. Alonso-Gómez y cols. (74) demostraron que, para inducir síntomas alérgicos, el *A. simplex* debía parasitar el tracto digestivo.

Se han descrito 13 alérgenos en el *A. simplex*. Los pacientes en primer lugar entran en contacto con los antígenos somáticos (tienen una función estructural en el parásito) y, posteriormente, con los antígenos de excreción/secreción

(productos secretados por el parásito para penetrar en los tejidos del huésped) (66). Estudios realizados con el extracto de excreción/secreción (E/S) del *A. simplex* han observado una potencia antigénica mayor que en el extracto somático, medida por niveles de IgE específica y tamaño de pápula de pacientes alérgicos a este parásito (73). Además, los alérgenos reconocidos por los pacientes alérgicos al *A. simplex* provienen, la mayoría de ellos, de los productos de E/S (71).

Las dos patologías descritas en relación con el *A. simplex* se corresponden probablemente con la respuesta del huésped a la infección parasitaria. La respuesta mediada por IgE que desencadena los síntomas alérgicos facilitaría la expulsión del parásito. Sin embargo, la ausencia de esta respuesta puede limitar la expulsión permitiendo que la larva penetre en la mucosa gástrica (75).

2.4. Teoría de la higiene y el equilibrio Th1/Th2

En 1989, Strachan postuló la “Teoría de la higiene” (76), por la cual el incremento de la incidencia en las enfermedades alérgicas observado en los últimos años en los países industrializados podría ser debido a una disminución de la exposición a infecciones en la infancia. La falta del estímulo de la inmunidad dirigida a patógenos, potenciaría la respuesta inmune tipo 2 (mediada por linfocitos Th2 e inductora de la respuesta alérgica por IgE) a costa de la respuesta tipo 1 (mediada por linfocitos Th1 y responsable de la respuesta inmune frente a infecciones virales, bacterianas o causadas por protozoos) (77). Sin embargo, los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha no han demostrado una asociación directa e inversa entre la sensibilización alérgica y las infecciones respiratorias en la infancia. Se ha postulado que el ascenso de la patología alérgica se asocia también con el uso de antibióticos en la infancia y los cambios en la dieta,

cuya influencia en la microbiota intestinal podría alterar la maduración del sistema inmune, induciéndose así la respuesta alérgica (78).

Sin embargo, el incremento de las enfermedades alérgicas en los países industrializados se ha asociado paralelamente con un aumento de la incidencia de las enfermedades autoinmunes (mediadas por una respuesta Th1), como la diabetes tipo I o la esclerosis múltiple (79). Además, los defectos en la vía de señalización de la IL-12 o el IFN- γ (citoquinas promotoras de una respuesta Th1) no se relacionan con una mayor gravedad de las enfermedades alérgicas (80). De esta forma, el paradigma Th1/Th2 no parece explicar completamente las diferencias observadas en la prevalencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes en las distintas regiones, por lo que deberán existir otros mecanismos que las justifiquen y que, probablemente, sean comunes tanto en las respuestas tipo 1 como en las tipo 2.

En los países en vías de desarrollo se ha observado una mayor prevalencia de las infecciones parasitarias. Curiosamente, y a pesar de que tanto las infecciones parasitarias como las patologías alérgicas comparten los mecanismos de respuesta inmune tipo 2, varios autores relacionan las infecciones por helmintos con una menor incidencia de asma bronquial (81) y atopia (entendida como positividad en las pruebas cutáneas) (82, 83). Además, se ha observado un incremento de la atopia en pacientes de zonas endémicas parasitarias que recibieron un tratamiento anti-helmíntico (84-86). Aunque los estudios son controvertidos porque otros autores no observan que las infecciones por helmintos disminuyan la incidencia de asma bronquial (87, 88). Varias revisiones posteriores postulan que las diferencias encontradas en estos estudios podrían deberse a varios factores como son las

especies de parásitos estudiadas, la duración y la intensidad de la infección parasitaria y el momento de la infección en relación con la sensibilización alérgica (89-93). En un intento de aclarar estas diferencias, el grupo de Leonardi-Bee y cols. (94, 95) realizaron dos metanálisis. En el primero encuentran que la infección por *Ascaris lumbricoides* se asocia a un mayor incidencia de asma bronquial, mientras que la infección por *Necatus americanus* se asocia con una reducción de la misma, siendo más intensa esta protección en las infecciones más graves. Sin embargo, no se encontró esta asociación en otras parasitosis intestinales (como en las producidas por *Tricuris trichuria*, *Enterobius vermicularis* y *Strongyloides stercoralis*). La mayor diferencia entre *N. americanus* y el resto de parásitos intestinales es su ciclo vital: la entrada del *N. americanus* en el huésped sucede a través de la barrera cutánea, alcanza el torrente sanguíneo y a través de él llega a los pulmones, ascendiendo por la tráquea hasta ser deglutidos, residiendo posteriormente en el intestino delgado. Scrivener y cols. (81) postulan que para darse la protección observada en estos parásitos es necesaria la existencia de una fase sistémica en el huésped. En el segundo metanálisis, Feary y cols. (95), observan que las infecciones por *Ascaris lumbricoides*, *Tricuris trichuria*, *Necatus americanus* y *Schistosoma mansoni* se relacionan con una disminución del riesgo de atopia.

2.5. Equilibrio Th1/Th17/Th2/Treg

Los Treg son capaces de inhibir la respuesta de los linfocitos Th1 y Th2 *in vitro* a través del contacto directo célula-célula, pudiendo controlar el desarrollo de enfermedades alérgicas y autoinmunes. Las células Treg se desarrollan a partir de los linfocitos T CD4⁺ y se caracterizan por la expresión de Foxp3, siendo su

fenotipo CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺. En el hombre, existen dos poblaciones de Treg, las CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ llamadas naturales o centrales (nTreg) que se desarrollan en el timo y las adaptativas o inducidas (aTreg) que se desarrollan en la periferia bajo la influencia de ciertas citocinas como TGF- β . Las Treg se caracterizan por producir TGF- β e IL-10 (96).

Los linfocitos Th17, secretoras de IL-17, se han relacionado con la inducción y el mantenimiento del daño tisular ya que son capaces de inducir en la mayoría de las células del parénquima la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tisular alfa (TNF- α), IL-1 β e IL-6 y otras quimiocinas proinflamatorias como el CXCL8 (97).

Los linfocitos Th1, Th17, Th2 y Treg son capaces de antagonizarse entre ellos. La IL-12, promotora de la diferenciación de los linfocitos Th1, inhibe el desarrollo de las células Th2. La IL-4, promotora de los linfocitos Th2, inhibe el desarrollo de las células Th1. El interferón-gamma (IFN- γ), producido por las células Th1, bloquea el desarrollo de los linfocitos Th17 y Th2. Por último los linfocitos Treg inhiben el desarrollo de las células Th1 y Th2 por contacto directo (Figura 5, izquierda). En el desarrollo de la enfermedad alérgica se ha observado una disminución de los linfocitos aTreg circulantes que frecuentemente se asocia con el aumento de los linfocitos Th17 que al activar los mastocitos, inducen la liberación de citocinas proinflamatorias (como el factor de necrosis tumoral, TNF- α) induciendo una inflamación marcada y el remodelado de la vía aérea. Así, en la enfermedad alérgica, se activan y maduran las células dendríticas de tal manera que éstas inducen el primado y la diferenciación de las células inflamatorias Th2 (iT_H2) liberadoras de TNF- α . Los linfocitos Th17 también contribuyen al

desarrollo de la patología alérgica. Por otro lado, en los pacientes alérgicos asintomáticos se desarrollan tanto los linfocitos Th2 como los Treg productores de IL-10 (Figura 5, derecha) (98).

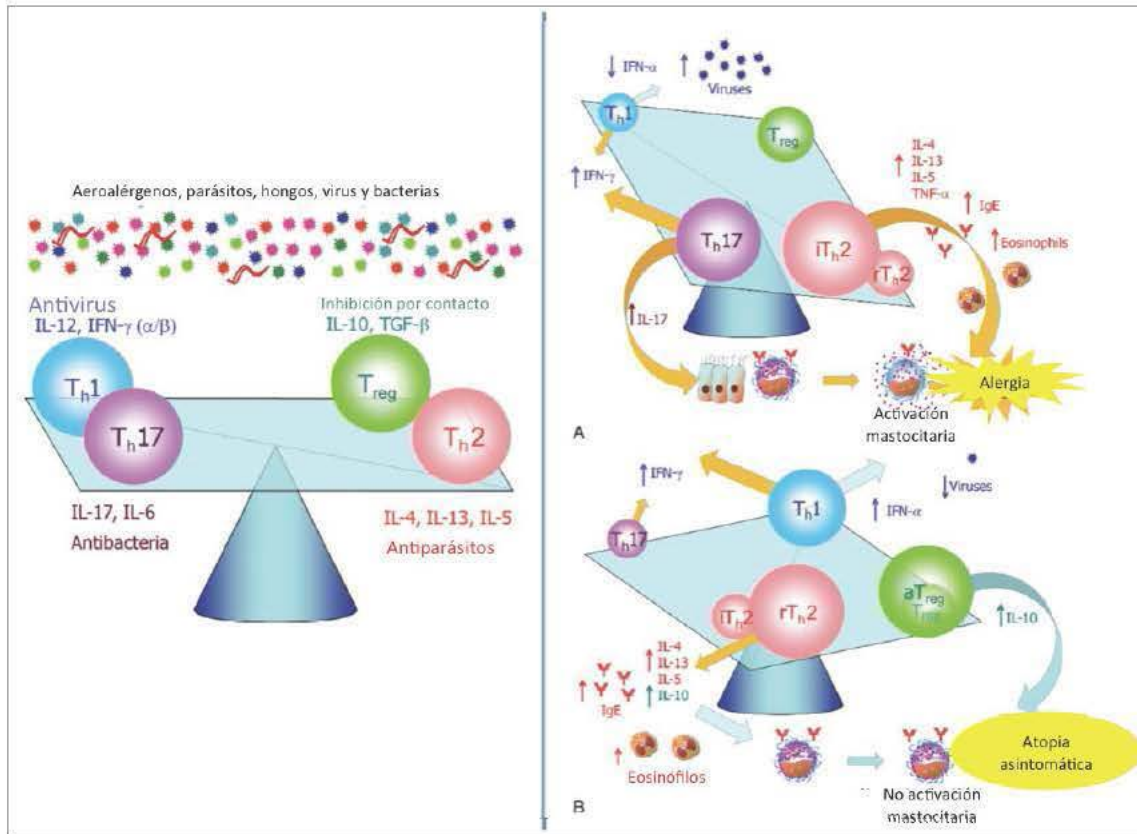


Figura 5. Equilibrio Th1/Th17/Th2/Treg. A la izquierda, se muestra el equilibrio entre estos cuatro tipos celulares. A la derecha y arriba, se muestra como el desarrollo de las células inflamatorias Th2 junto con las células Th17 inducen la enfermedad alérgica, mientras que la expansión de células Th2 junto con las Treg induce el desarrollo de una repuesta Th2 asintomática.. Modificado de Orihara y cols. (98).

2.6. Infección por parásitos y enfermedades alérgicas

Como ya se ha mostrado previamente, muchos de los estudios realizados en poblaciones endémicas de parásitos muestran una asociación de éstos con un menor riesgo de presentar atopia y asma bronquial. A pesar de que tanto los helmintos como las enfermedades alérgicas desencadenan una respuesta Th2, las diferencias en sus mecanismos son notables. Las respuestas Th2 alérgicas inducen

una mayor producción de IL-5 y una menor producción de IL-10 e IgG4 que las respuestas Th2 modificadas por la infección parasitaria. Estas diferencias se detallan en la Tabla II (59).

Mecanismos efectores	Respuesta Th2 alérgica	Respuesta Th2 parasitaria
IL-10	+	+++
IL-5	+++	+
IL-4	+++	++++
IL-13	+++	++++
IgE	+++	++++
IgG4	+	+++
Ratio células Th2 : Treg	Th2 > Treg	Th2 < Treg

Tabla II. Características de la respuesta Th2 alérgica frente a la respuesta Th2 inducida en las infecciones por helmintos. Modificada de Fallon y cols (59).

Muchos investigadores han tratado de trasladar la modulación del sistema inmune inducida por las infecciones parasitarias a distintos modelos murinos de enfermedad alérgica para poder comprender los mecanismos responsables de cómo los parásitos son capaces de modular el sistema inmune favoreciendo esta protección. Esto podría ayudar a encontrar tratamientos potencialmente beneficiosos para esta patología. Además, se ha observado como la sustitución de los parásitos vivos por los antígenos derivados de helmintos ayuda a evitar los efectos adversos desencadenados por la infección parasitaria y permiten establecer de forma más precisa los mecanismos moleculares de modulación en el huésped (99).

Recientemente, Evans y cols. (100) han realizado una revisión exhaustiva de estos estudios en animales. En cuanto a los modelos realizados sobre asma bronquial, la mayor parte de los estudios muestran como la administración de parásitos pueden proteger frente al desarrollo de hiperreactividad bronquial en varias cepas de ratón (14 estudios con administración temprana de parásitos vivos

(101-114) y 11 estudios con administración de antígenos derivados de helmintos (115-125)). Por el contrario, Pinelli y cols. (126) encuentran que la administración de parásitos vivos no protege frente al desarrollo de alergia. Estos datos se encuentran resumidos en la Tabla III.

Efecto protector	Parásitos vivos o antígenos derivados de helmintos	Helminto	Huésped	Referencia
Sí	Parásitos	<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	BALB/c	(101)
Sí	Parásitos	<i>Heligmosomoides polygirus</i>	BALB/c	(102)
Sí	Parásitos	<i>Heligmosomoides polygirus</i>	BALB/c y C57BL/6	(103)
Sí	Parásitos	<i>Heligmosomoides polygirus</i>	BALB/c y C57BL/6	(104)
Sí	Parásitos	<i>Heligmosomoides polygirus</i>	BALB/c y C57BL/6	(105)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma japonicum</i>	BALB/c	(106)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma japonicum</i>	BALB/c	(107)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma japonicum</i>	BALB/c	(108)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma mansoni</i>	BALB/c y C57BL/6	(109)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma mansoni</i>	BALB/c	(110)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma mansoni</i>	BALB/c	(111)
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma mansoni</i>	C57BL/6	(112)
Sí	Parásitos	<i>Strongyloides stercoralis</i>	BALB/c	(113)
Sí	Parásitos	<i>Trichinella spiralis</i>	C57BL/6	(114)
Sí	Antígenos	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	BALB/c	(115)
Sí	Antígenos	<i>Clonorchis sinensis</i>	BALB/c	(116)
Sí	Antígenos	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	BALB/c, C57BL/6 y C3H/HeJ	(117)
Sí	Antígenos	<i>Ascaris suum</i>	C57BL/6 y B10.A	(118)
Sí	Antígenos	<i>Ascaris suum</i>	BALB/c, C57BL/6 y A/J	(119)
Sí	Antígenos	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	BALB/c	(120)
Sí	Antígenos	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	BALB/c	(121)
Sí	Antígenos	<i>Schistosoma japonicum</i>	BALB/c	(122)
Sí	Antígenos	<i>Schistosoma mansoni</i>	BALB/c	(123)
Sí	Antígenos	<i>Schistosoma mansoni</i>	BALB/c	(124)
Sí	Antígenos	<i>Toxascaris leonina</i>	BALB/c	(125)
No	Parásitos	<i>Toxocara canis</i>	BALB/c	(126)

Tabla III. Modelos murinos sobre asma bronquial y prevención del desarrollo de alergia. Modificado de Evans y cols (100).

Sin embargo, al analizar si esta protección se mantiene en modelos donde la sensibilización alérgica es inducida previamente a la inoculación de los parásitos, se encuentran 6 estudios en la literatura. Cuatro de ellos, muestran como los parásitos pueden tener un efecto terapéutico (Wilson y cols. (104) lo realizaron con parásitos vivos mientras que los otros tres se realizaron con antígenos derivados de helmintos (115, 116, 127)). Por otro lado, los dos estudios restantes no encuentran dicho efecto terapéutico (Wohleben y cols. (128) lo realizaron con parásitos vivos, Trujillo-Vargas y cols. (117) lo realizaron con antígenos derivados de helmintos) (Tabla IV).

Efecto protector	Parásitos vivos o antígenos derivados de helmintos	Helminto	Huésped	Referencia
Sí	Parásitos	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	BALB/c y C57BL/6	(104)
Sí	Antígenos	<i>Anisakis simplex</i>	BALB/c	(127)
Sí	Antígenos	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	BALB/c	(115)
Sí	Antígenos	<i>Clonorchis sinensis</i>	BALB/c	(116)
No	Parásitos	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	BALB/c y C57BL/6	(128)
No	Antígenos	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	BALB/c, C57BL/6 y C3H/HeJ	(117)

Tabla IV. Modelos murinos sobre asma bronquial y tratamiento de la alergia establecida. Modificado de Evans y cols (100).

Las diferencias observadas entre los diferentes estudios podrían estar influenciadas por el tipo de infección (localizada vs sistémica), la intensidad de la infección (leve vs grave), la duración de la infección (aguda vs crónica) y por la especie de helminto empleado.

Con respecto a los estudios realizados en modelos de anafilaxia sistémica y prevención de la alergia a través de los parásitos, en la literatura se encuentran tres estudios. Dos de ellos, fueron realizados en ratones BALB/c y C57BL/6 y uno

muestra como la infección parasitaria temprana es capaz de proteger frente al desarrollo de alergia (129), mientras que el de Michels y cols. (130) no pudo comprobar este efecto. Por otro lado, destaca el estudio realizado por Bashir y cols. (33) en ratones C3H//HeJ en los que se observa como la infección parasitaria protegía de la anafilaxia sistémica (Tabla V).

Efecto protector	Parásitos vivos o antígenos derivados de helmintos	Helminto	Huésped	Referencia
Sí	Parásitos	<i>Schistosoma mansoni</i>	BALB/c y C57BL/6	(129)
Sí	Parásitos	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	C3H/HeJ	(33)
No	Parásitos	<i>Syphacia obvelata</i>	BALB/c y C57BL/6	(130)

Tabla V. Modelos murinos sobre la anafilaxia sistémica y la prevención del desarrollo de alergia. Modificado de Evans y cols (100).

Hipótesis

Las infecciones por helmintos desencadenan una respuesta inmunitaria Th2 similar a la observada en las reacciones alérgicas. Curiosamente, la prevalencia de enfermedades alérgicas es más baja en aquellas zonas donde las infecciones por helmintos son endémicas. Por ello, se hipotetiza que las infecciones por helmintos pueden tener un efecto inmunomodulador e inhibir la respuesta anafiláctica. Para verificar esta hipótesis, se desarrollará un modelo murino de anafilaxia sistémica empleando el cacahuete como alérgeno y se estudiará la respuesta anafiláctica en los ratones previamente expuestos a proteínas del *Anisakis simplex*.

Objetivos

1. Objetivos primarios

- Desarrollar un modelo murino de anafilaxia sistémica inducida por cacahuete que permita obtener una respuesta clínica e inmunológica potente.
- Analizar los efectos inhibitorios de dos antígenos del *Anisakis simplex* (antígeno somático y excreción/secreción (E/S)) en el modelo murino de anafilaxia.

2. Objetivos secundarios

- Comparar la respuesta clínica e inmunológica de dos cepas de ratón (C3H/HeOuJ y BALB/c) empleando el modelo murino de anafilaxia y seleccionar aquella cepa que presente una respuesta anafiláctica clínicamente más evidente.
- Optimizar la dosis de extracto de cacahuete necesario para la sensibilización.
- Analizar los efectos inmunomoduladores de los antígenos del *Anisakis simplex* en la respuesta clínica e inmunológica (humoral y celular).

Materialles y métodos

El estudio realizado se divide en 3 fases: en primer lugar, se desarrolla el modelo de anafilaxia y se compara las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c, para seleccionar aquella con una clínica de anafilaxia más acentuada. Posteriormente, se estudia la dosis de antígeno que produce una respuesta anafiláctica más evidente. Por último, se analiza el efecto protector de los antígenos del *Anisakis simplex*, tanto del extracto somático como del de E/S, sobre la anafilaxia.

1. Desarrollo del modelo de anafilaxia y selección de la cepa

1.1. Ratones y extractos

Se adquirieron hembras de 5 semanas de vida de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c de los Laboratorios Charles River (Barcelona, España). Todos los ratones permanecieron en ciclos controlados de 12 horas de luz-oscuridad con acceso libre al agua y comida en el animalario de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital Gregorio Marañón (Madrid, España), siguiendo las Normativas Europeas de Experimentación Animal (Directiva: 86/609/EEC). Todos los experimentos han sido aprobados por el Comité de cuidados animales de esta institución. Todos los ratones tuvieron un periodo de adaptación de 7 días previo al inicio del estudio y fueron vigilados diariamente y de forma estrecha por veterinarios ajenos al proyecto.

El extracto de cacahuete se realizó con frutos secos obtenidos de Productos Manzanares S.A., España. Se lavaron 370 g de cacahuete en agua destilada, se trituraron y se mezclaron con 500 ml de tampón fosfato (PBS, pH: 7,4), manteniéndose en agitación durante la noche a 8°C. Se centrifugó el extracto a

18.000 g durante 30 minutos a 4°C. Tras retirar la fracción grasa, se obtuvo la fracción acuosa. Posteriormente, se dializó a PBS con una membrana Millipore® de 3.000 Dalton, se concentró en una cámara Hamilton® y, finalmente, se pasó por un filtro de 0,2 µm. El extracto obtenido se congeló a -40°C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó mediante Bradford en 3 mg/ml. Una parte de este extracto de cacahuete, se reservó para el cultivo de esplenocitos procediéndose a la retirada de los lipopolisacáridos (LPS) mediante su filtrado por un gel eliminador de endotoxinas Detoxi-Gel® (Thermo Scientific, Illinois, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido este nuevo extracto, se volvió a pasar por un filtro de 0,2 µm y se procedió a determinar la concentración de proteína mediante Bradford siendo ésta de 2 mg/ml.

La toxina pertussis (TP) y el hidróxido de aluminio se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU) y la Concanavalina A Sepharosa (conA) se obtuvo de Phadia (Uppsala, Suecia).

1.2. Protocolo de sensibilización

Se dividieron los ratones de ambas cepas (C3H/HeOuJ y BALB/c) en dos grupos: al primero de ellos, se le administró extracto de cacahuete (grupo activo: C3H-AC y BALB-AC), mientras que el segundo recibió las dosis de suero salino (placebo) (grupo control: C3H-NAC y BALB-NAC). Los ratones del grupo activo recibieron tres dosis, una semanal, de cacahuete (500 µg), hidróxido de aluminio (1 mg) y TP (300 ng) por vía intraperitoneal (i.p.), siguiendo el protocolo desarrollado previamente por Baeza y cols. (39). Los ratones del grupo control de ambas cepas recibieron dosis equivalentes de solución salina en presencia

exclusivamente de adyuvantes. Se realizó una extracción sanguínea a todos los ratones de forma semanal, previa anestesia con isofluorano inhalado (Figura 6).

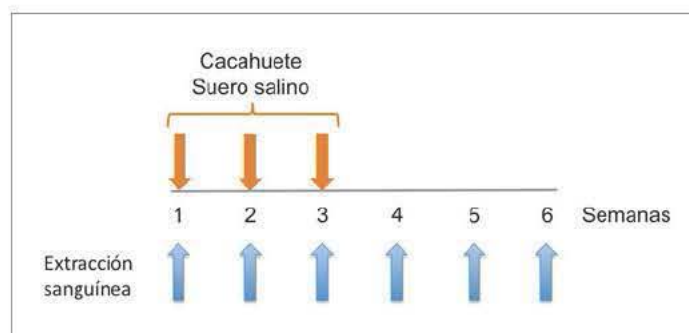


Figura 6. Protocolo de sensibilización para el desarrollo del modelo de anafilaxia y elección de la cepa más adecuada.

1.3. Demostración de la sensibilización a cacahuete

Se determinaron los niveles de IgE sérica y de IgE, IgG1 e IgG2a específicas a cacahuete (sIgE, sIgG1 y sIgG2a, respectivamente) mediante ELISA. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

1.3.1. Determinación de IgG1 e IgG2a específicas a cacahuete

Se utilizaron las placas de microtitulación de 96 pocillos en las que se fijó el extracto de cacahuete diluido en buffer carbonato a una concentración de 1 mg/ml durante 18 horas a 4°C. Las placas se bloquearon con 1% albúmina bovina (BSA) en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Tras lavar las placas con tampón de borato sódico, pH 7,4 (BBS)-0,05% Tween 20 (Sigma), se incubaron durante 18 horas con sueros de los ratones diluidos en 1% BSA-PBS (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700). Se realizó una curva de referencia en cada placa con diluciones seriadas del suero de un grupo de ratones hiperinmunes. Después de los lavados, se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón biotinilado (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, EEUU) y

estreptavidina a una dilución 1:2000 en BSA-PBS (Zymed, San Francisco, CA, EEUU), se lavó y, posteriormente, se incubó con p-nitrofenil fosfato (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania). Una hora después, se procedió a la lectura de la placa mediante espectrofotómetro BioRad® a una longitud de onda de 405 nm. Se determinaron unidades arbitrarias (U.A.) por extrapolación de los valores de la absorbancia en la curva patrón realizada con el suero hiperinmune.

1.3.2. Determinación de la IgE específica a cacahuete

La medición de IgE específica se realizó mediante ELISA de forma similar. En este caso, las muestras se incubaron previamente con Sepharosa proteína G (Phadia, Uppsala, Suecia) para la absorción previa de la IgG sérica. Se añadieron bolas de proteína G-absorbente y se incubaron durante 18 horas a 4°C para, posteriormente, recuperar el sobrenadante. Para la realización del ELISA, en placas similares incubadas con extracto de cacahuete, se empleó anticuerpo de cabra anti-IgE de ratón biotinilado a una concentración de 6 µg/ml (Becton Dickinson, PharMingen, San Diego, CA, EEUU). Tras lavar, se añadieron 0,62 µg/ml de estreptavidina. Por último, se añadieron 50 µl/pocillo de TMB peroxidasa (3,3',5,5'-tetrametil benzidina, KirKegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EEUU). La reacción se paró con ácido fosfórico 2M cuando los standards seriados presentaban coloración gradual. La lectura de las placas se realizó a 450-650 nm. Se determinaron unidades arbitrarias (U.A.) por extrapolación de los valores de la absorbancia en la curva patrón realizada con el suero hiperinmune.

1.3.3. Determinación de IgE total

La medición de IgE total se realizó mediante ELISA de un modo similar a la técnica anterior, empleando IgE de ratón purificada para la curva de referencia (PharMingen) y anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón.

1.4. Valoración de la respuesta anafiláctica

1.4.1. Protocolo de provocación

A las 6 semanas de la dosis inicial de sensibilización, todos los ratones fueron provocados mediante la administración i.p. de 1 mg cacahuete, induciéndose así una respuesta anafiláctica (Figura 7).

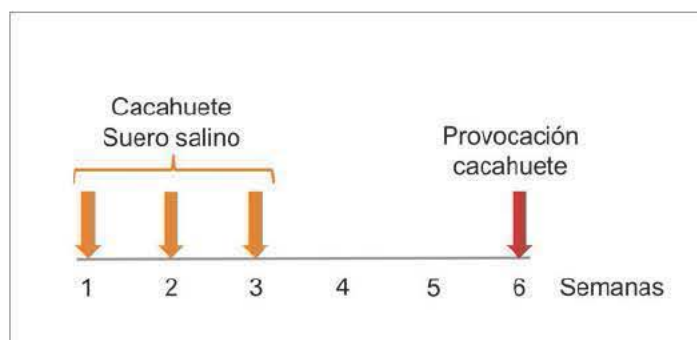


Figura 7. Protocolo de provocación para el desarrollo del modelo de anafilaxia y elección de la cepa más adecuada.

1.4.2. Puntuación de síntomas

Después de la provocación de los ratones con el cacahuete, se evaluaron los síntomas anafilácticos cada 2 minutos durante un tiempo total de 30 minutos. Para su determinación, se empleó una valoración de los síntomas descrita por Xu y cols. (131) y detallada en la Tabla VI. El investigador encargado de valorar los síntomas de la anafilaxia era diferente en todo momento del que medía la temperatura corporal, para mantener la objetividad del resultado.

Puntuación de síntomas	Grados de shock	Descripción
0	No signos de shock	
1	Shock leve	prurito, piloerección, disnea y disminución de la actividad espontánea
2	Shock moderado	postración, lentitud de movimientos, escasa actividad tras la estimulación
3	Shock grave	paresia, inactividad tras la estimulación con o sin convulsiones
4	Muerte dentro de los 30 minutos	

Tabla VI. Descripción de la puntuación de síntomas anafilácticos (score clínico) descrito por Xu y cols. (131).

1.4.3. Temperatura corporal

Al mismo tiempo que la puntuación de síntomas, se midió la temperatura corporal empleando un termómetro rectal (4600 thermometer, Measurement Specialities, Temperature Products Group, Ohio, USA).

1.4.4. Determinación de histamina

Se seleccionaron, en un experimento independiente, 6 ratones sensibilizados de cada cepa (BALB/c y C3H/HeOuJ) y se extrajo sangre, 15 minutos después de la provocación i.p. con cacahuete. Para la medición de la histamina basal se procedió a la extracción sanguínea, 24 horas antes de la provocación con cacahuete. Los ratones que fueron empleados para esta medición, no participaron en la evaluación de la respuesta anafiláctica. La muestra sanguínea se introdujo en tubos fríos que contenían 7,5% EDTA-potasio. Tras centrifugarlos a 900 g durante 10 minutos a 4°C, se congelaron las alícuotas a -80°C hasta su posterior determinación. La medición de histamina se realizó mediante un kit de inmunoensayo (ImmunoTECH Inc., Marsella, Francia) según la recomendación del fabricante. Brevemente, se mezclaron el tampón de acilación con las muestras y la solución de acilación reconstituida. Posteriormente, se distribuyeron las muestras en los pocillos, junto con el conjugado histamina-fosfatasa alcalina reconstituido y

se incubó durante 18 horas a 8°C sin agitación. Tras lavar las placas con la solución de lavado, se añadió el sustrato (para-nitro fenil fosfato mezclado con el tampón de sustrato) y se incubó durante 30 minutos, a 24°C, en agitación (350 rpm) en la oscuridad. La reacción se paró con hidróxido de sodio 1N y se leyó la absorbancia a 405-414 nm.

1.5. Determinación del perfil de citocinas

1.5.1. Aislamiento, cultivo y estimulación de esplenocitos

Terminada la provocación con cacahuete, se sacrificaron los ratones y se les extirpó el bazo, extrayendo los esplenocitos mediante disgregación con 2 pinzas estériles. Tras recoger la suspensión celular, se lavaron empleando RPMI-1640 con 2% de suero bovino fetal (FBS) inactivado, 2mM L-glutamina, 1% estreptomycin/penicilina y 0,05 mM 2-mercaptoetanol. A continuación, los esplenocitos se suspendieron en RPMI-1640 con 10% FBS inactivado, 2 mM L-glutamina, 1% de estreptomycin/penicilina, 0,05 mM 2-mercaptoetanol. Se cultivaron los esplenocitos en una placa de 96 pocillos (5×10^5 células/pocillo) en presencia o en ausencia de extracto de cacahuete sin LPS a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Se recogieron los sobrenadantes 72 horas después, que se mantuvieron congelados a -80°C hasta su posterior determinación.

1.5.2. Determinación de citocinas

La medición de IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10 se realizó mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, EEUU). Brevemente, se utilizaron las placas de microtitulación de 96 pocillos en las que se fijó el anticuerpo de captura y se incubaron a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras lavar las placas con tampón de borato sódico, pH 7,4 (BBS)-

0,05% Tween 20 (Sigma), se bloquearon con 1% BSA-PBS durante 2 horas a 37°C. Se añadieron las muestras y se incubaron durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el anticuerpo biotinilado en 1% BSA-PBS, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se añadió la estreptavidina-enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Se mantuvo a temperatura ambiente y resguardado de la luz durante 20 minutos. Se añadió la mezcla de TMB. La reacción se paró con ácido fosfórico 2M cuando los standards seriados presentaban coloración gradual. La lectura de las placas se realizó a 450-650 nm.

2. Selección del protocolo de anafilaxia

Una vez seleccionada la cepa C3H/HeO_uJ, se inició la búsqueda de la dosis de antígeno más adecuada para el modelo.

2.1. Protocolo de sensibilización y protocolo de provocación

Se dividieron los ratones en cuatro grupos. Tres de estos grupos recibieron las diferentes dosis del extracto (grupos activo) y uno recibió dosis de suero salino (grupo control).

Cada grupo activo recibió de forma semanal tres dosis i.p. de cacahuete: 250 µg p en el primer grupo (AC-250), 100 µg en el segundo grupo (AC-100) y 50 µg en el tercer grupo (AC-50). Todas las dosis fueron combinadas con hidróxido de aluminio (1 mg) y TP (150 ng). Los ratones del grupo control (NAC) recibieron dosis equivalentes de solución salina en presencia exclusivamente de adyuvantes (Figura 8).

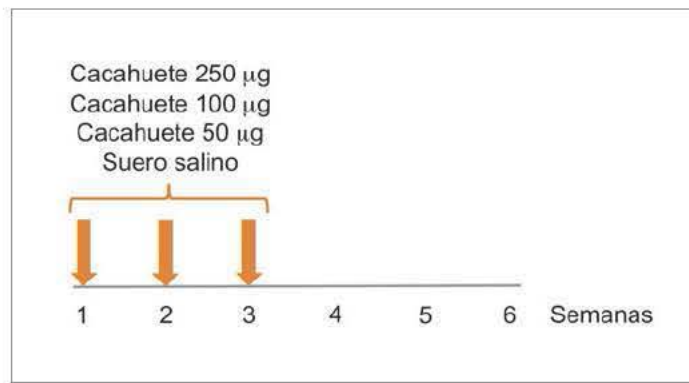


Figura 8. Protocolo de sensibilización para la selección de la dosis antigénica óptima para el modelo.

2.2. Valoración de la respuesta anafiláctica

2.2.1. Protocolo de provocación

A las 6 semanas de la dosis inicial de sensibilización, todos los ratones fueron provocados mediante la administración vía i.p. de 100 µg cacahuete, induciéndose así una respuesta anafiláctica (Figura 9).

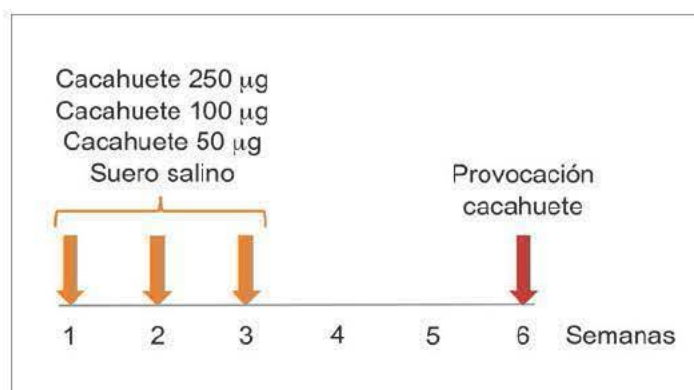


Figura 9. Protocolo de provocación para la selección de la dosis antigénica óptima para el modelo.

2.2.2. Puntuación de síntomas y medida de la temperatura corporal

Tras la provocación de los ratones con el cacahuete, se evaluaron los síntomas anafilácticos cada 5 minutos durante un tiempo total de 30 minutos. Para

su determinación, se empleó una tabla de puntuación de síntomas descrita por Xu y cols. (131). También, se midió la temperatura corporal cada 5 minutos.

3. Prevencción de la anafilaxia con los extractos de *Anisakis simplex*

Una vez seleccionada la dosis de antígeno más adecuada para el modelo, se procedió a estudiar la capacidad de los extractos de *Anisakis simplex*, tanto el antígeno somático como el de E/S, de prevenir la anafilaxia en este modelo.

3.1. Extractos de *Anisakis simplex*

Para el extracto somático, se compraron merluzas en el mercado local y se extrajeron las larvas vivas de *A. simplex* manualmente con pinzas. Se lavaron extensamente las larvas con agua estéril, se trituraron y se mezclaron con PBS (pH: 7,4) manteniéndose en agitación durante la noche a 8°C. Se centrifugó el extracto a 18.000 g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se dializó a PBS con una membrana Millipore® de 3.000 Dalton, se concentró en una cámara Hamilton® y, finalmente, se pasó por un filtro de 0,2 µm. El extracto obtenido se congeló a -40°C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó mediante Bradford en 3,78 mg/ml.

El extracto de excreción/secreción, se preparó en una solución de PBS (pH: 7,4), gentamicina (150 µg/ml), vancomicina (10 µg/ml) y 1% glucosa a la que se añadieron 100 larvas vivas de *Anisakis simplex* (Figura 10) provenientes de pescado fresco y se mantuvieron en una cámara a 37°C y con 5% de CO₂ durante 5 días a una concentración de 2 larvas/ml. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se dializó a PBS con una membrana Millipore® de 3.000 Dalton durante la noche a 8°C. Tras pasarlo por un filtro de 0,2 µm, se congeló a -40°C

hasta su uso. La concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford en 32 µg/ml.



Figura 10. Larvas vivas de *A. simplex* extraídas de *Merluccius merluccius* comprado en la pescadería. Las larvas fueron cultivadas en una solución de PBS, gentamicina, vancomicina y glucosa.

3.2. Pretratamiento con los extractos de *Anisakis simplex*

Se dividieron los ratones C3H/HeO_uJ en cuatro grupos de nueve ratones cada uno. Los tres primeros fueron sensibilizados recibiendo 3 dosis (1 por semana) por vía i.p. de 100 µg cacahuete cada una junto con los adyuvantes. Paralelamente, un grupo de ratones se trató a diario con una dosis i.p. de 100 µg del extracto somático de *A. simplex* (grupo AC+AK), un segundo grupo con una dosis i.p. de 3 µg diaria del extracto de E/S de *A. simplex* (grupo AC+E/S), otro grupo se trató a diario con una dosis i.p. con un volumen equivalente de solución salina (grupo AC). Los ratones del grupo control, recibieron 3 dosis (1 por semana)

de solución salina en presencia de adyuvantes y paralelamente, recibieron a diario dosis i.p. con un volumen equivalente de suero salino (grupo NAC).

A todos los ratones, se les realizó una extracción sanguínea al inicio del estudio y, semanalmente, a partir de la semana 2. Previo a cada extracción sanguínea todos los ratones fueron anestesiados con isofluorano inhalado (Figura 11).

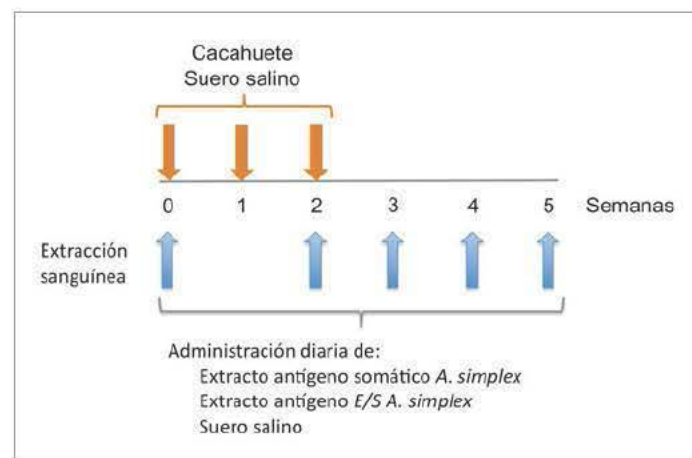


Figura 11. Protocolo de sensibilización para la prevención de la anafilaxia con los extractos de *Anisakis simplex*.

3.3. Demostración de la sensibilización a cacahuete

Se determinaron los niveles de IgE sérica y de IgE, IgG1 e IgG2a específicas a cacahuete (sIgE, sIgG1 y sIgG2a, respectivamente) en sangre mediante ELISA siguiendo los protocolos descritos en el apartado 1.3.

3.4. Valoración de la respuesta anafiláctica

A las 5 semanas de la dosis inicial de sensibilización, todos los ratones fueron provocados mediante la administración i.p. de cacahuete, induciéndose así una respuesta anafiláctica (Figura 12).

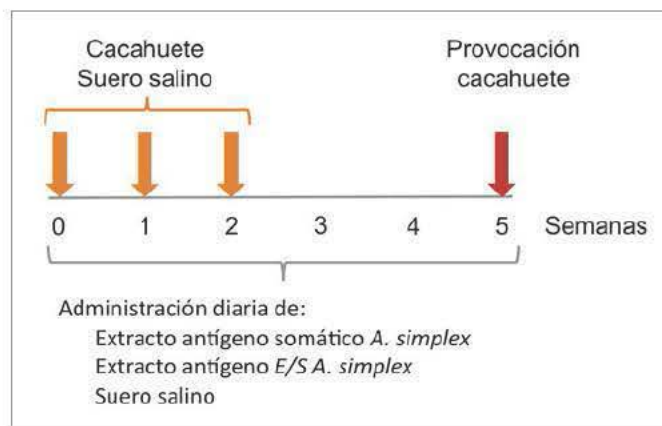


Figura 12. Protocolo de provocación para la prevención de la anafilaxia con los extractos de *Anisakis simplex*.

Tras la provocación de los ratones con el cacahuete, se evaluaron los síntomas anafilácticos a los 5, 10, 20 y 30 minutos post-provocación. Mediante la puntuación de síntomas descrita por Xu y cols. (131). Simultáneamente, se midió la temperatura corporal a los 5, 10, 20 y 30 minutos post-provocación. En otro experimento, se realizó la determinación de histamina en todos los grupos.

3.5. Determinación del perfil de citocinas

Terminada la provocación con cacahuete, se sacrificaron los ratones y se les extirpó el bazo. El cultivo de los esplenocitos se realizó de forma análoga a lo descrito en el apartado 1.5 y se determinaron los niveles de IL-4, IL-5, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-10.

4. Procedimientos estadísticos

Los resultados que se muestran corresponden a la media de tres experimentos diferentes. Se analizaron los datos mediante el software Stata (v 13,1, StataCorpo, TX, EEUU).

Se empleó el análisis de la variancia (ANOVA) con la corrección de Welch para el estudio estadístico de inmunoglobulinas específicas (sIgE, sIgG1, sIgG2a), IgE total, temperatura corporal, histamina y citocinas. El score clínico se estudió mediante el test exacto de Fisher. Se expresan los resultados como la media \pm error estándar de la media (ESM). Diferencias estadísticas menores a 0,05 se consideraron positivas.

Además, el estudio estadístico de la puntuación de síntomas incluyó el algoritmo cluster de las *K*-medias. Este algoritmo es una técnica estadística no paramétrica que busca particionar un conjunto de objetos en grupos similares a partir de la información proporcionada por las variables observadas en cada uno de ellos. Los objetos de un mismo grupo han de tener propiedades comunes y diferenciadas de los objetos pertenecientes a otros grupos. Este algoritmo inicializa con dos individuos como medias de los grupos iniciales. El siguiente paso es asignar a los individuos restantes el grupo cuyo centro sea el más cercano y así tener una partición inicial. Tras esto se calculan las nuevas medias de los grupos y si se ha mejorado el criterio se reitera el proceso hasta alcanzar estabilidad. El criterio que se usa es la Suma de los cuadrados dentro de los grupos.

Resultados

1. Desarrollo del modelo de anafilaxia y selección de la cepa

En este primer estudio, se aplicó el protocolo descrito en el punto 1 de los Materiales y Métodos en ratones de las cepas C3H/HeO_uJ y BALB/c. Brevemente, en los grupos activos de ambas cepas se realizó un protocolo de sensibilización administrando cacahuete y adyuvantes semanalmente (tres dosis) por vía i.p., mientras que los grupos controles de ambas cepas recibieron dosis equivalentes de salino y adyuvantes. A las 6 semanas del inicio del estudio, se realizó una provocación con cacahuete administrado por vía i.p.

De esta forma, los grupos en los que se dividieron los grupos de ratones son los indicados en la Tabla VII.

	Número de ratones	Sensibilización semanal (3 dosis)	Nombre abreviado
Ratones C3H/HeO _u J	7	Cacahuete + Al(OH) ₃ + TP	C3H-AC
	7	Salino + Al(OH) ₃ + TP	C3H-NAC
Ratones BALB/c	7	Cacahuete + Al(OH) ₃ + TP	BALB-AC
	7	Suero salino + Al(OH) ₃ + TP	BALB-NAC

Tabla VII. Grupos de ratones englobados en el primer estudio.

1.1. Sensibilización al cacahuete

Semanalmente se realizó una extracción sanguínea en los distintos grupos de ratones para la determinación de IgG1, IgG2a e IgE específicas a cacahuete (sIgG1, sIgG2a, sIgE, respectivamente) así como niveles de IgE total.

1.1.1. IgG1 e IgG2a específicas a cacahuete

Tras la sensibilización, ambas cepas produjeron sIgG1 e sIgG2a con un patrón similar y con un aumento progresivo de las mismas durante las semanas del

estudio. Comparativamente, los ratones C3H/HeOuJ produjeron niveles de sIgG de forma más temprana y permanecieron constantemente más elevados que en los BALB/c. Los niveles de sIgG1 fueron significativamente más elevados en la cepa C3H/HeOuJ a partir de la segunda semana (17.719 ± 2.242 UA en la cepa C3H/HeOuJ y 782 ± 264 UA, media \pm ESM, respectivamente) ($p=0,0062$) y esta diferencia se mantuvo durante las 6 semanas del estudio. En la semana 5 los niveles de sIgG1 en el grupo C3H/HeOuJ aumentaron un 1.270% más que los niveles del grupo BALB/c (203.998 ± 42.281 UA y 16.057 ± 6.840 UA, media \pm ESM, $p=0,0062$). En los grupos control, no se detectaron inmunoglobulinas específicas (Figura 13).

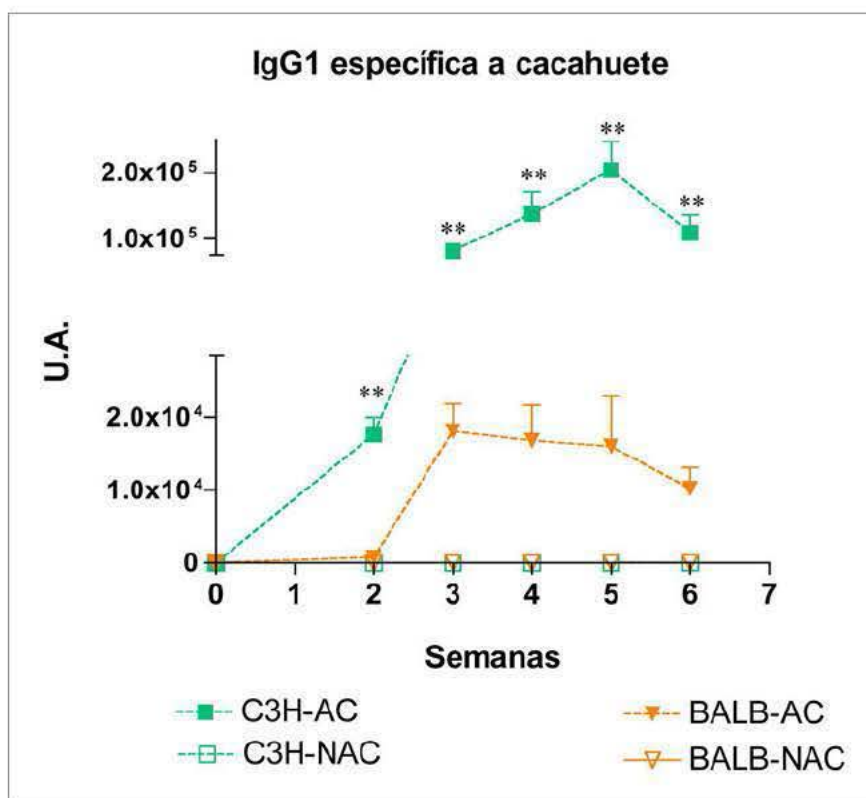


Figura 13. Niveles séricos de IgG1 específica a cacahuete en los grupos sensibilizados (C3H-AC y BALB-AC) y en los grupos control (C3H-NAC y BALB-NAC) durante 6 semanas. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

De forma análoga, los niveles de sIgG2a fueron significativamente más elevados en la cepa C3H/HeOuJ desde la segunda semana (12.272 ± 2.082 UA en la cepa C3H/HeOuJ y 971 ± 23 UA en la cepa BALB/c) ($p=0,0106$). En la semana 5 los niveles de sIgG2a en el grupo C3H/HeOuJ aumentaron un 1.314% más que los niveles del grupo BALB/c (81.774 ± 17.403 UA vs 6.221 ± 1.380 UA, respectivamente). En los grupos control, no se detectaron inmunoglobulinas específicas (Figura 14).

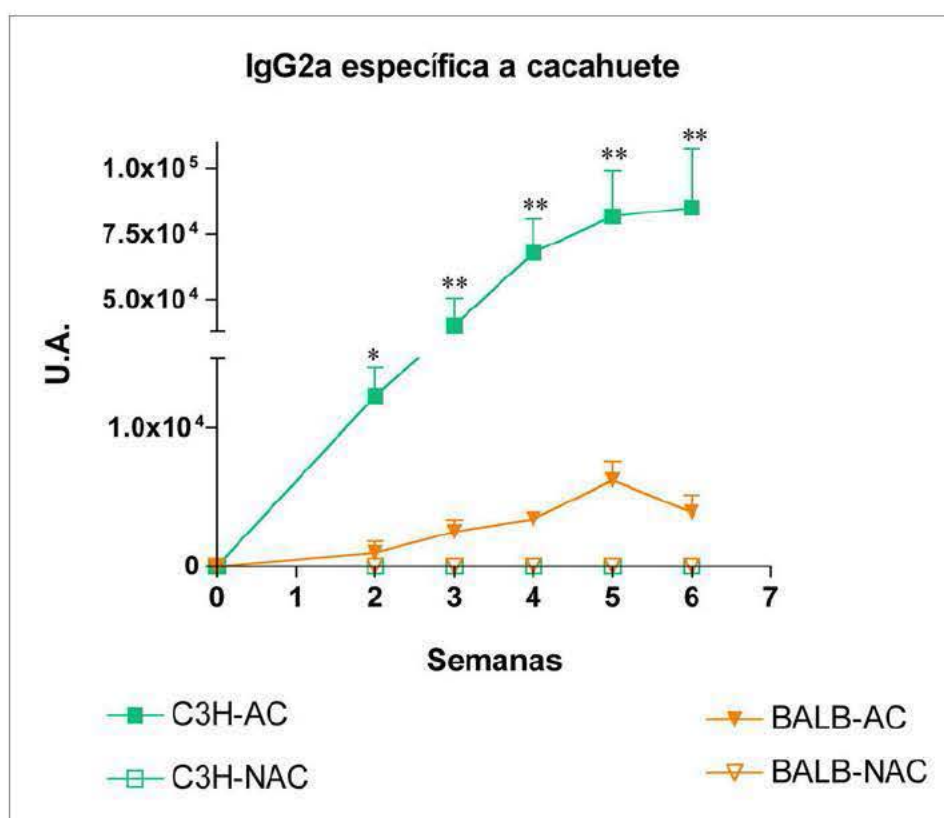


Figura 14. Niveles séricos de IgG2a específica a cacahuete en los grupos sensibilizados (C3H-AC y BALB-AC) y en los grupos control (C3H-NAC y BALB-NAC) durante 6 semanas. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

1.1.2. IgE específica a cacahuete

Los ratones sensibilizados de ambas cepas produjeron IgE específica a cacahuete en la semana 6 del estudio. Los ratones C3H/HeOuJ produjeron niveles

de IgE específica 540% más elevados ($29,7 \pm 4,7$ UA/ml) que los BALB/c ($5,5 \pm 1,3$ UA/ml) ($p=0,007$) (Figura 15).

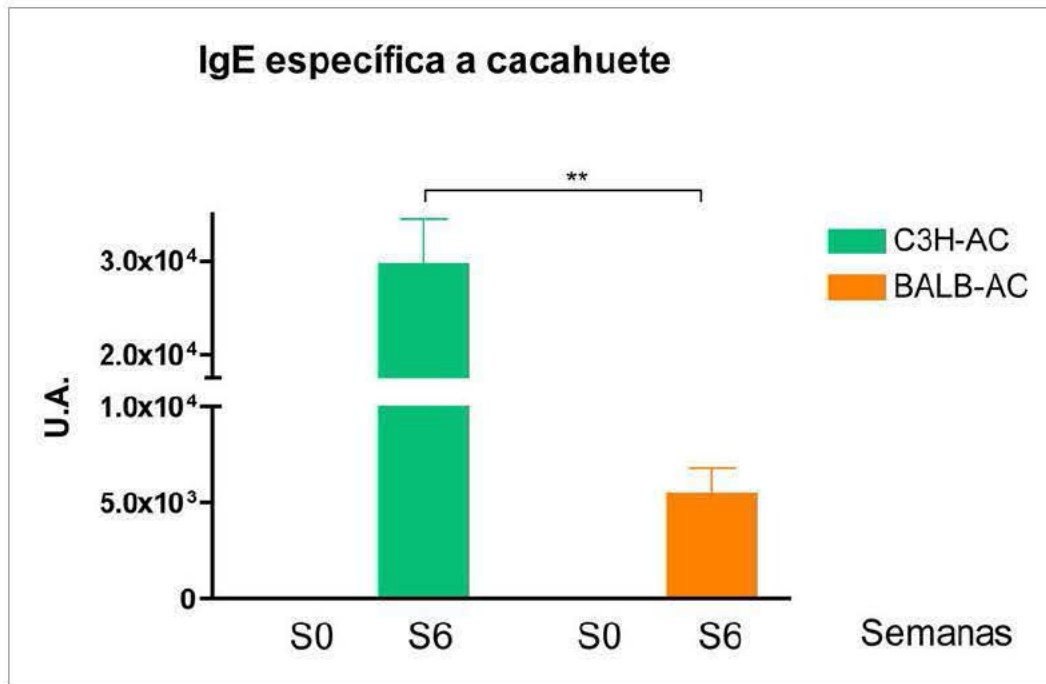


Figura 15. Niveles de IgE específica a cacahuete en los grupos sensibilizados al inicio (Semana 0, S0) y al finalizar el estudio (Semana 6, S6). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

1.1.3. IgE total

La Figura 16 muestra los niveles de IgE total de ambas cepas al inicio (semana 0) y al final (semana 6) del estudio en los ratones sensibilizados. Tanto el grupo C3H/HeOuJ como BALB/c incrementaron significativamente los niveles de IgE total durante el estudio ($729,7 \pm 166,8$ UA, $p=0,0064$ en el grupo C3H/HeOuJ y $1.613,8 \pm 434,8$ UA, $p=0,0137$ en el BALB/c). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IgE total de ambas cepas en la semana 6.

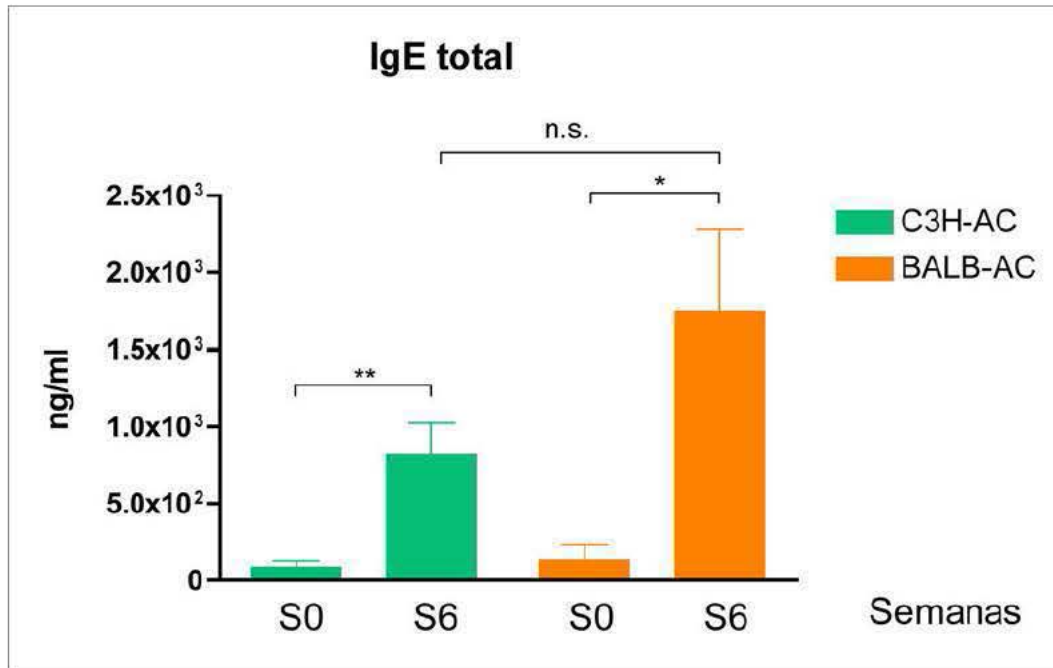


Figura 16. Niveles de IgE total sérica en los grupos sensibilizados al inicio (Semana 0; S0) y al finalizar el estudio (Semana 6; S6). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

1.2. Respuesta anafiláctica

En la sexta semana, todos los ratones C3H/HeOuJ y BALB/c fueron provocados mediante la administración de 1 mg de cacahuete por vía i.p.. Durante los 30 minutos siguientes, se evaluaron detenidamente los síntomas y se midió la temperatura corporal.

1.2.1. Síntomas y temperatura corporal

Todos los ratones sensibilizados presentaron síntomas de anafilaxia y sufrieron un descenso brusco de su temperatura corporal. Los ratones no sensibilizados no sufrieron cambios tras la administración del extracto de cacahuete. Los ratones de la cepa C3H/HeOuJ presentaron una mayor puntuación de síntomas que los BALB/c (a los 30 minutos de la provocación con cacahuete, la mediana de los

síntomas en el grupo C3H-AC fue de 3-4 frente a una puntuación de 2 en el grupo BALB-AC).

La temperatura corporal comenzó a descender en los grupos sensibilizados a partir del minuto 6, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos de ratones no sensibilizados a partir del minuto 10 en el grupo C3H/HeOuJ (descenso de 0,94°C frente a 0°C, $p<0,01$) (Tabla VIII). Los ratones BALB/c comenzaron a presentar diferencias significativas con su grupo control a partir del minuto 18 (descenso de 1,86°C en los sensibilizados frente a 0°C en el grupo control, $p<0,01$). (Figura 17)

Descenso de la temperatura corporal (°C) (%)				
Minutos	C3H-AC	BALB-AC	C3H-NAC	BALB-NAC
6	-0,43°C (-1,11%)	-0,60°C (-1,52%)	0°C (0%)	0°C (0%)
10	-0,94°C (-2,41%)	-1,00°C (-2,58%)	0°C (0%)	0°C (0%)
14	-1,90°C (-4,91%)	-1,34°C (-3,39%)	0°C (0%)	0°C (0%)
20	-3,30°C (-8,52%)	-2,14°C (-5,42%)	0°C (0%)	0°C (0%)
24	-3,70°C (-9,55%)	-2,50°C (-6,33%)	0°C (0%)	0°C (0%)
30	-4,42°C (-11,41%)	-2,70°C (-6,83%)	-0,20°C (-0,51%)	-0,33°C (-0,86%)

Tabla VIII. Porcentaje de descenso de la temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los ratones sensibilizados (AC) y los no sensibilizados (NAC).

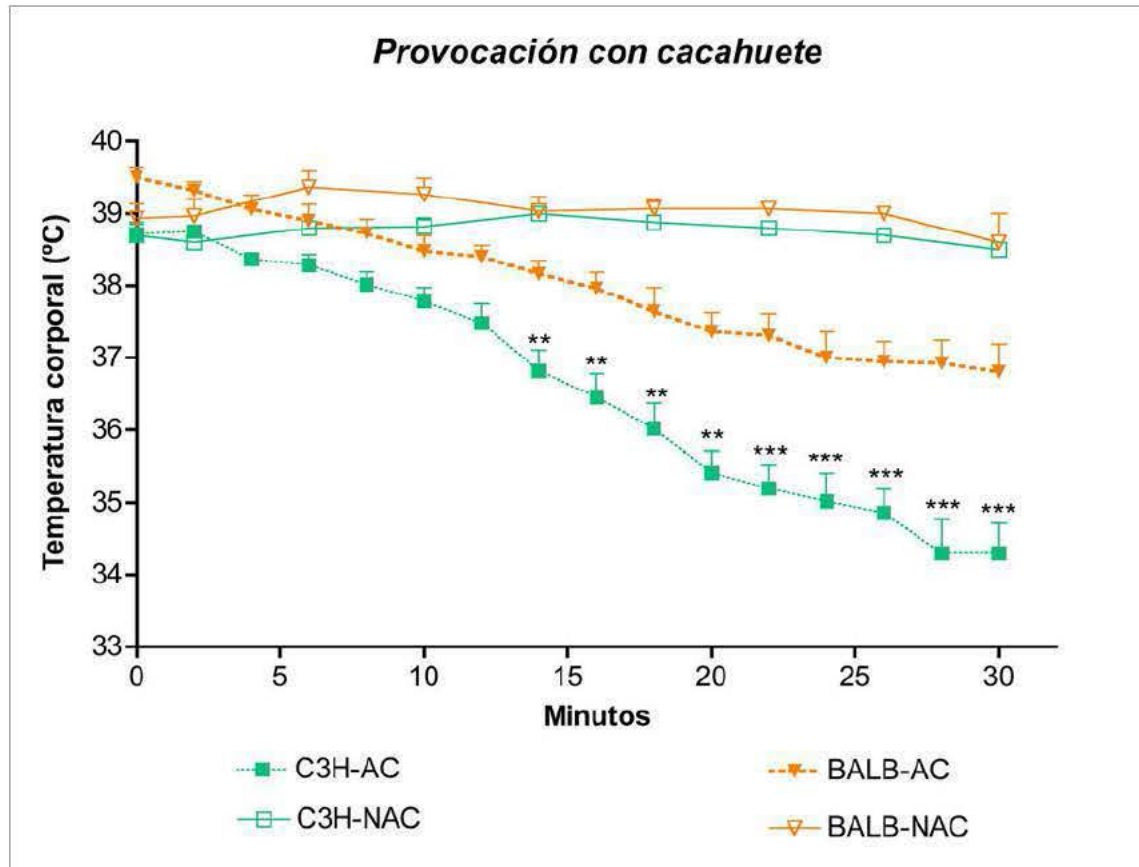


Figura 17. Temperatura corporal en los ratones sensibilizados y en los controles durante 30 minutos y tras la provocación con cacahuete. Se muestran las diferencias significativas entre los grupos sensibilizados de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Clínicamente y comparando con la cepa BALB/c, se observó que los ratones C3H/HeOuJ sufrieron una reacción más intensa: la reacción se inició más rápidamente y los síntomas fueron más graves que en la cepa BALB/c y significativamente evidentes desde el minuto 14 (descenso de temperatura de 1,90°C en C3H/HeOuJ frente a 1,34°C en los BALB/c, $p < 0,01$), encontrándose máximas diferencias a los 30 minutos (descenso de 4,42°C en el grupo C3H/HeOuJ frente a 2,70°C en el grupo BALB/c, $p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos control de ambas cepas (Figura 17).

1.2.2. Niveles de histamina

En un grupo paralelo de ratones, se midieron en ambas cepas los niveles de histamina plasmática liberada 15 minutos después de la provocación con cacahuete. Los niveles de histamina en los ratones C3H/HeOuJ sensibilizados (19.608 ± 4.005 nMolar) fueron más elevados que en el grupo homólogo de ratones BALB/c (2.895 ± 562 nMolar, $p=0,0043$), lo que concuerda con los síntomas clínicos observados. No se detectó liberación de histamina en los grupos controles (Figura 18).

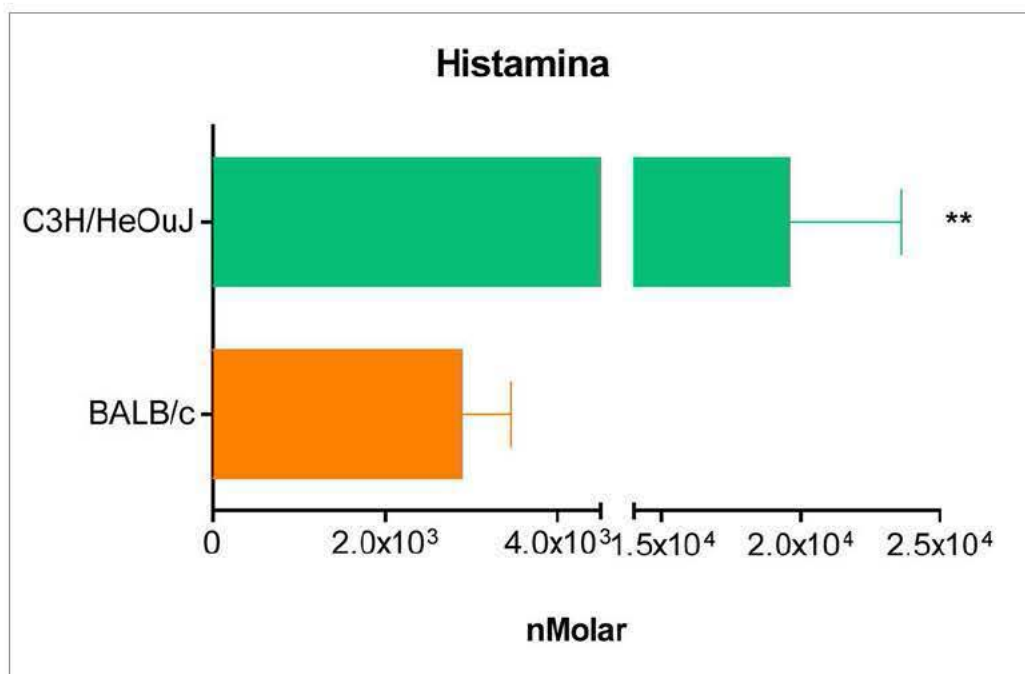


Figura 18. Niveles de histamina plasmática 15 minutos después de la provocación con cacahuete en ratones BALB/c y C3H/HeOuJ sensibilizados a cacahuete. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (** $p<0,01$).

1.3. Perfil de citocinas

Tras la provocación, se sacrificaron todos los ratones y se midieron las citocinas secretadas por los esplenocitos estimulados con cacahuete. Se midieron

las citocinas típicas de una respuesta tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), tipo 1 (IFN- γ e IL-12) y una citocina reguladora (IL-10) en ambas cepas.

El perfil de citocinas medido en los esplenocitos de ambas cepas fue mixto. Se encontró un aumento de los niveles de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th1 (IFN- γ) y reguladoras (IL-10) tras el estímulo específico. Sin embargo, los grupos control no liberaron ninguna citocina tras la estimulación celular con cacahuete. Destacan los niveles elevados de IL-5 en este modelo de anafilaxia (Tabla IX).

Citocinas (pg/ml)	C3H-AC	BALB-AC	Significación estadística
IL-5	554 \pm 87	1.901 \pm 656	p=0,008
IFN-γ	171 \pm 18	677 \pm 224	p=0,048
IL-10	351 \pm 64	615 \pm 198	p>0,05
IL-13	163 \pm 74	478 \pm 190	p>0,05
IL-4	37 \pm 12	134 \pm 54	p=0,0381

Tabla IX. Niveles de citocinas en los grupos sensibilizados de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c.

Contrariamente a la intensidad de los síntomas anafilácticos observados previamente, los linfocitos de los ratones BALB/c produjeron niveles más elevados de citocinas que los ratones C3H/HeOuJ (Figura 19), encontrándose diferencias significativas en los niveles de IL-4 (134 \pm 54 pg/ml en el grupo BALB/c frente a 37 \pm 12 pg/ml en el C3H/HeOuJ, p=0,0381), (Figura 19A) e IL-5 (1.901 \pm 656 pg/ml en el grupo BALB/c frente a 554 \pm 87 pg/ml en el C3H/HeOuJ, p=0,008), (Figura 19B). De forma similar, los niveles de IFN- γ (Th1) fueron más elevados en la cepa BALB/c que en la C3H/HeOuJ (677 \pm 224 pg/ml y 171 \pm 18 pg/ml, respectivamente, p=0,048), (Figura 19D). No se detectó liberación de IL-12 (Figura 19F) en ninguna de las cepas. Sin embargo, los ratios IFN- γ /IL-5 e IL-10/IL-5 fueron aproximadamente los mismos.

Se midieron los niveles de la citocina reguladora (IL-10) en ambos grupos, siendo ligeramente superior en el grupo BALB/c sin obtener significación estadística (615 ± 198 pg/ml frente a 351 ± 64 pg/ml, $p=0,23$) (Figura 19E).

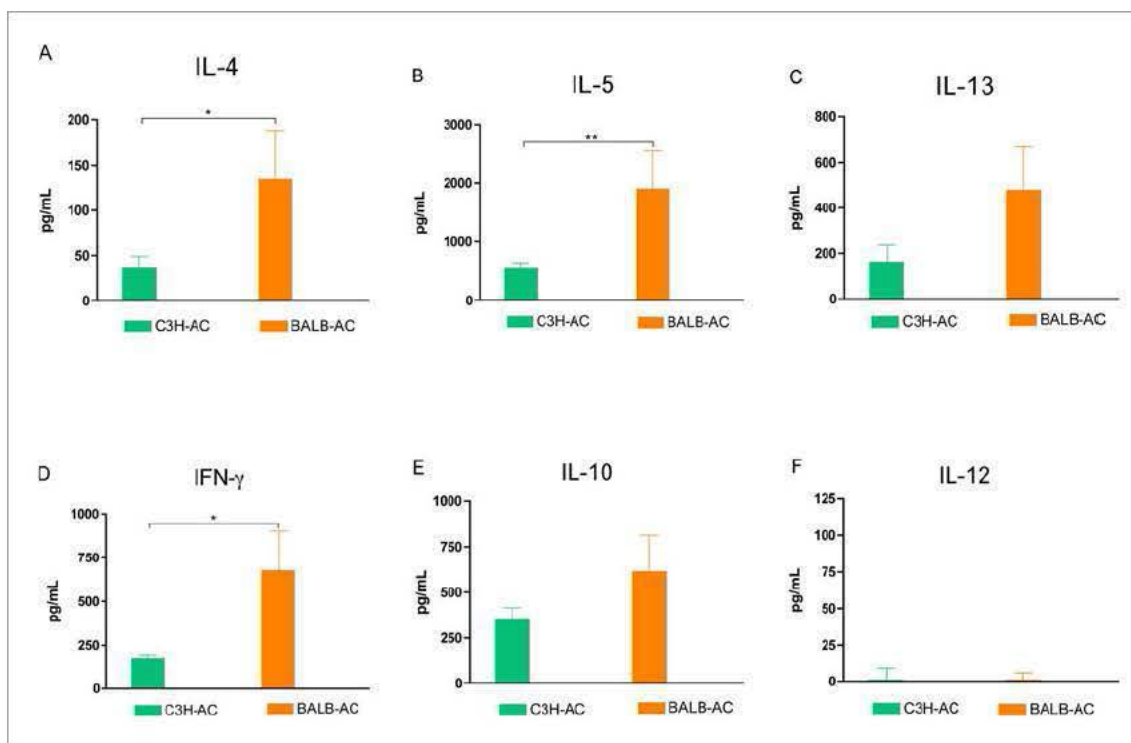


Figura 19. Perfil de citocinas (A: IL-4; B: IL-5; C: IL-13; D: IFN- γ ; E: IL-10; F: IL-12) en grupos sensibilizados de las cepas C3H/HeOuJ y BALB/c. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Con este primer estudio, se pretendía seleccionar la cepa de ratón que presentara una respuesta anafiláctica más evidente. Por ello, se optó por la cepa C3H/HeOuJ para los estudios sucesivos ya que presentó una respuesta anafiláctica más clara que los ratones BALB/c y asoció una respuesta humoral más definida.

2. Selección del protocolo de anafilaxia

En este segundo estudio, se aplicó el protocolo descrito en el punto 2 de Materiales y Métodos. Brevemente, se sensibilizaron ratones C3H/HeOuJ mediante

la administración semanal de tres dosis i.p. de adyuvantes y cacahuete en diferentes dosis: 250 µg (grupo AC-250), 100 µg (grupo AC-100) y 50 µg (grupo AC-50). Los ratones del grupo control recibieron dosis equivalentes de solución salina en presencia exclusivamente de adyuvantes. A las 6 semanas del inicio del estudio, se realizó una provocación con cacahuete administrado por vía i.p.

De esta forma, los grupos en los que se dividieron los grupos de ratones son los indicados en la Tabla X.

Grupos ratones C3H/HeOul		
Número de ratones	Sensibilización semanal (3 dosis)	Nombre abreviado
4	Cacahuete (250) + Al(OH) ₃ + TP	AC-250
4	Cacahuete (100) + Al(OH) ₃ + TP	AC-100
4	Cacahuete (50) + Al(OH) ₃ + TP	AC-50
4	Suero salino + Al(OH) ₃ + TP	NAC

Tabla X. Grupos de ratones englobados en el segundo estudio.

2.1. Selección de dosis

En la sexta semana, todos los ratones C3H/HeOul fueron provocados mediante la administración i.p. de cacahuete. Durante los 30 minutos siguientes, se observaron detenidamente para evaluar los síntomas y se midió la temperatura corporal.

2.1.1. Síntomas de anafilaxia

Todos los ratones sensibilizados presentaron síntomas de anafilaxia tras la provocación con cacahuete. Los ratones no sensibilizados no presentaron síntomas de anafilaxia. Los ratones que habían recibido dosis semanales de 100 µg mostraron síntomas anafilácticos a partir del minuto 10 y, progresivamente, los síntomas fueron empeorando durante toda la provocación, hasta los 30 minutos

donde todos los grupos sensibilizados presentaron la misma gravedad de síntomas.

Comparativamente, el inicio de los síntomas anafilácticos fue más temprano en los grupos AC-100 y AC-50 con respecto a los ratones AC-250. Sin embargo, el grupo AC-100 presentó síntomas más graves que el grupo AC-250 y el grupo AC-50 a lo largo de la provocación, aunque sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 20).

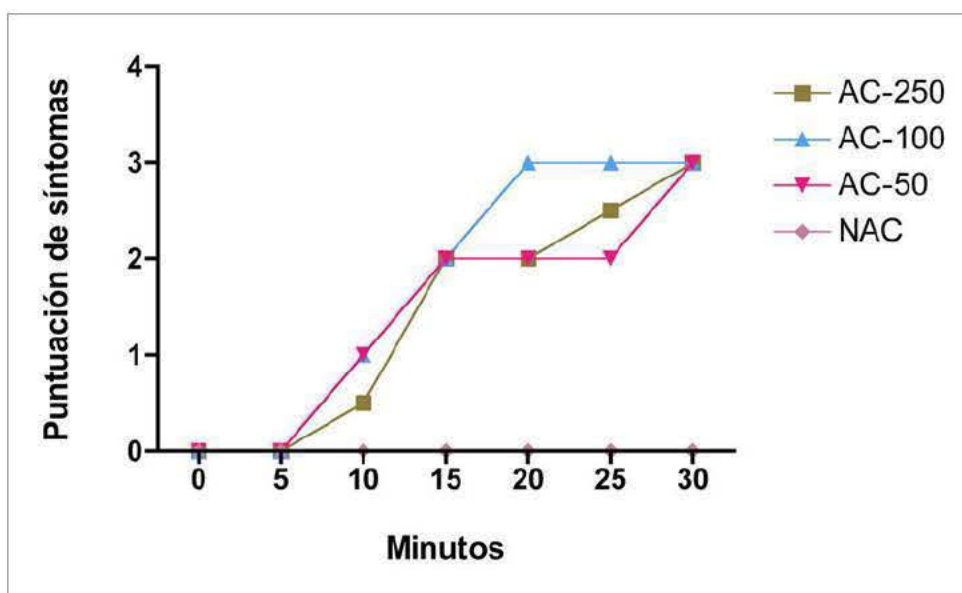


Figura 20. Representación de la mediana de la puntuación de síntomas en los ratones sensibilizados (AC-250, AC-100 y AC-50) y en los no sensibilizados (NAC).

2.1.2. Temperatura corporal

Todos los ratones sensibilizados presentaron síntomas de anafilaxia y sufrieron una caída brusca de su temperatura corporal. Los ratones que recibieron la dosis de 100 μ g durante la sensibilización mostraron la máxima respuesta anafiláctica: la caída de la temperatura se inició a los 5 minutos encontrándose un descenso de 0,95°C frente a 0,88°C y 0,20°C en el grupo AC-50 y AC-250, respectivamente (Tabla XI).

Descenso de la temperatura corporal (°C) (%)				
Minutos	AC-250	AC-100	AC-50	NAC
5	-0,20°C (-0,51%)	-0,95°C (-2,43%)	-0,87°C (-2,29%)	-0,23°C (-0,60%)
10	-1,65°C (-4,27%)	-2,45°C (-6,29%)	-2,66°C (-4,76%)	-0,18°C (-0,46%)
15	-2,97°C (-7,70%)	-5,23°C (-13,43%)	-4,23°C (-4,41%)	-0,33°C (-0,83%)
20	-5,29°C (-13,70%)	-7,08°C (-18,16%)	-5,83°C (-4,71%)	-0,25°C (-0,65%)
25	-6,93°C (-17,98%)	-9,24°C (-23,70%)	-7,43°C (-4,90%)	-1,10°C (-2,83%)
30	-7,70°C (-19,97%)	-10,96°C (-28,13%)	-9,96°C (-8,21%)	-1,25°C (-3,21%)

Tabla XI. Porcentaje de descenso de la temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los ratones que recibieron dosis de cacahuete de 250 µg, 100 µg y 50 µg.

El descenso de temperatura en el grupo AC-100 fue persistentemente más intenso encontrándose diferencias estadísticamente significativas desde el minuto 15 (descenso de 5,23°C en el grupo AC-100 frente a 2,97°C en el grupo AC-250, $p=0,0134$, y 4,23°C en el grupo AC-50). Las diferencias observadas fueron máximas en el minuto 30 siendo el descenso de la temperatura en el grupo AC-100 de 10,96°C y 7,70°C en el grupo AC-250, $p=0,0039$, y 9,96°C en el grupo AC-50. El grupo control no sufrió caída de la temperatura corporal (Figura 21).

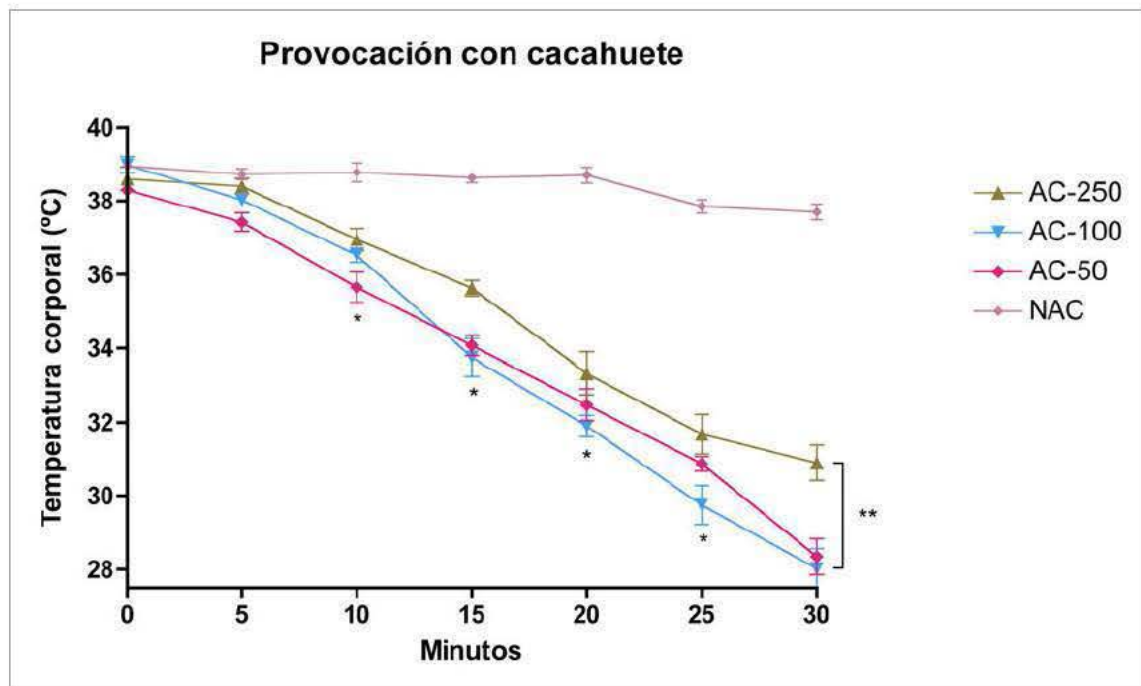


Figura 21. Temperatura corporal en ratones sensibilizados con diferentes dosis de cacahuete (AC-250, AC-100, AC-50) y controles (NAC). Las diferencias estadísticamente significativas que se muestran corresponden a las halladas entre el grupo AC-250 y el AC-100 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

De esta forma, el grupo AC-100 presentó una reacción anafiláctica más grave: el descenso de la temperatura fue más temprano, persistentemente superior y los síntomas fueron más graves que en los otros grupos de ratones sensibilizados a cacahuete.

Con este segundo estudio, se pretendía encontrar la dosis que indujese una respuesta anafiláctica más evidente. Por ello, se seleccionó la dosis de 100 μg ya que permite encontrar síntomas clínicos tempranos y graves.

3. Prevención de la anafilaxia con los extractos de *Anisakis simplex*

En este tercer estudio, se aplicó el protocolo descrito en el punto 2 de Materiales y Métodos. Brevemente, tres grupos de nueve ratones C3H/HeOuj recibieron de forma semanal tres dosis de cacahuete por vía i.p.. Paralelamente, un grupo de estos ratones se trató diariamente con extracto somático de *A. simplex* (grupo AC+AK), un segundo grupo se trató con extracto de E/S de *A. simplex* (grupo AC+E/S), un tercer grupo se trató con suero salino (grupo AC). Los ratones del grupo control al inicio recibieron dosis equivalentes de solución salina en presencia de adyuvantes y posteriormente fueron tratados con dosis equivalentes de solución salina (grupo NAC). A las 5 semanas del inicio del estudio, se realizó una provocación con cacahuete administrado por vía i.p.

De esta forma, los grupos en los que se dividieron los grupos de ratones son los indicados en la Tabla XII.

Grupos ratones C3H/HeOul			
Número de ratones	Sensibilización semanal (3 dosis)	Tratamiento diario	Nombre abreviado
9	Cacahuete + Al(OH) ₃ + TP	Suero salino	AC
9	Cacahuete + Al(OH) ₃ + TP	Ag. somático <i>A. simplex</i>	AC+AK
9	Cacahuete + Al(OH) ₃ + TP	Ag. Excreción/Secreción <i>A. simplex</i>	AC+E/S
9	Suero salino + Al(OH) ₃ + TP	Suero salino	NAC

Tabla XII. Grupos de ratones englobados en el tercer estudio.

3.1. Los extractos de *Anisakis simplex* inhiben parcialmente la sensibilización al cacahuete.

Se realizó extracción sanguínea a todos los ratones para la determinación de los niveles de IgG1, IgG2a e IgE específicas a cacahuete.

3.1.1. IgG1 e IgG2a específicas a cacahuete

Todos los ratones sensibilizados produjeron inmunoglobulinas específicas. Los niveles de sIgG1 se incrementaron progresiva y significativamente a partir de la semana 2. Los grupos de ratones sensibilizados que no habían sido tratados con extractos de *A. simplex* presentaron los niveles más elevados de sIgG1.

En la semana 4 los niveles de sIgG1 de los grupos tratados con los extractos de *A. simplex* fueron inferiores a los ratones no tratados. La mínima respuesta se obtuvo con el tratamiento con extracto somático de *A. simplex* ($2,4 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$ UA frente a $4,4 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^5$ UA y $3,4 \times 10^6 \pm 6,8 \times 10^5$ UA en el grupo AC y AC+ES, respectivamente, $p=0,001$ y $p>0,05$) (Figura 22).

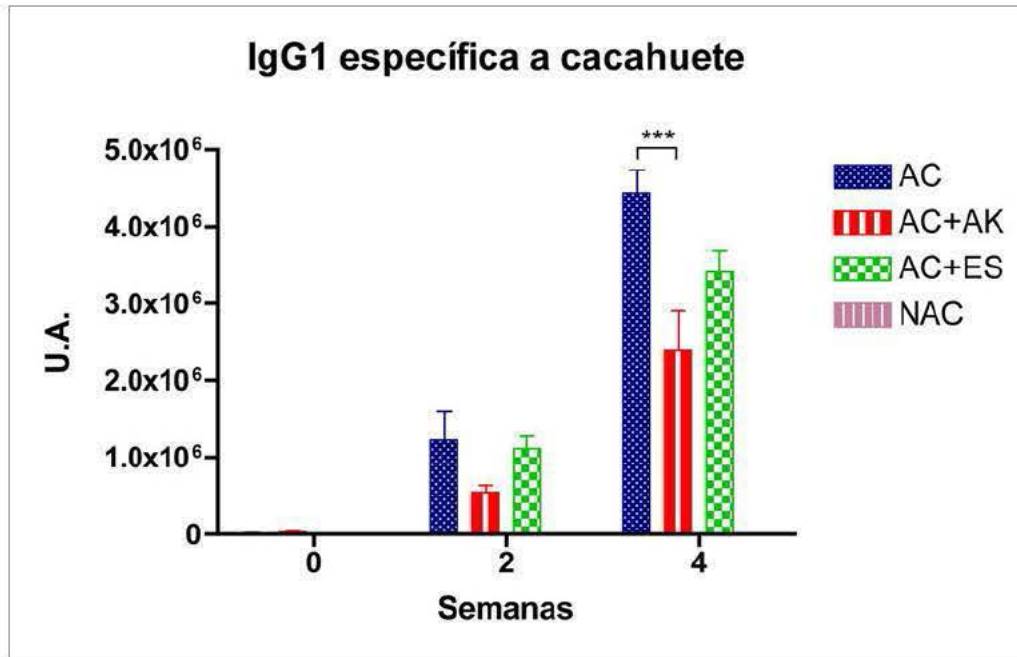


Figura 22. Niveles de IgG1 específica a cacahuete en los grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y en el grupo control (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (** $p < 0,001$). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

De la misma manera, en todos los ratones sensibilizados se encontró un aumento de los niveles de sIgG2a siguiendo un patrón similar: los niveles de sIgG2a se incrementaron progresiva y significativamente a partir de la semana 2, alcanzado su pico en la semana 4. Curiosamente de los ratones que fueron tratados con extractos de *A. simplex*, los que recibieron el extracto de E/S presentaron los niveles de sIgG2a más altos, mientras que los que recibieron el extracto somático, presentaron los niveles de sIgG2a más bajos.

Cabe destacar que los niveles más elevados de sIgG2a se encontraron en el grupo AC+E/S en la semana 4 ($6,4 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$ UA) y fueron significativamente más elevados que en los grupos AC y AC+AK ($1,9 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ UA y $2,7 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^5$ UA, respectivamente, $p=0,001$ y $p<0,001$). No se detectaron niveles de inmunoglobulinas en el grupo control (Figura 23).

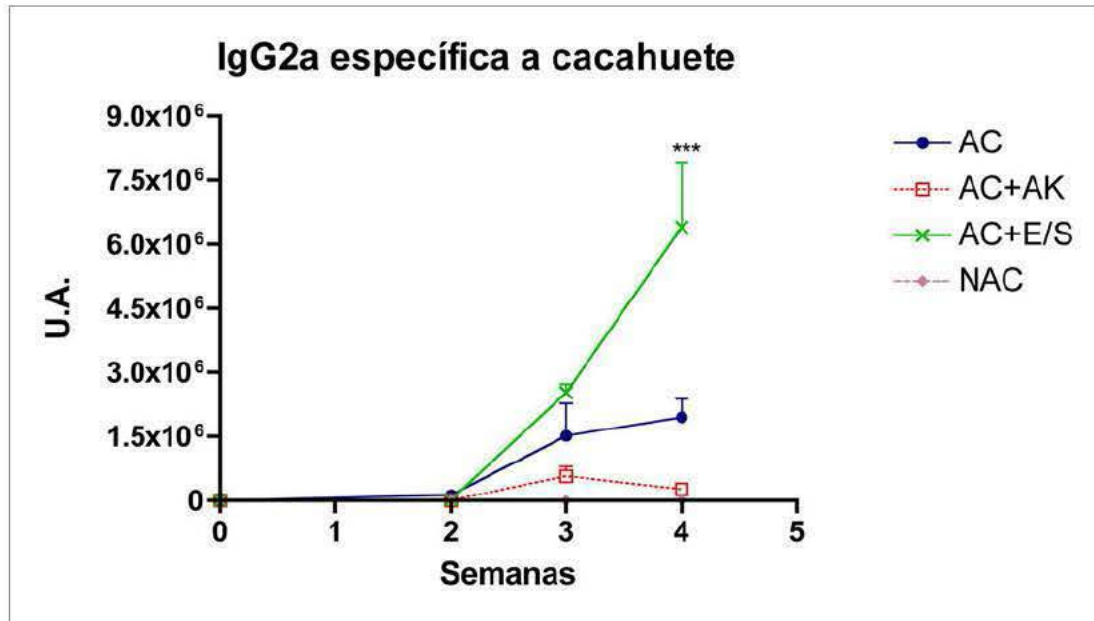


Figura 23. Determinación de IgG2a específica a cacahuete en grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y en el grupo control (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (** $p < 0,001$). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

3.1.2. IgE específica a cacahuete

Todos los ratones sensibilizados produjeron IgE específica a cacahuete. Los ratones que habían recibido tratamiento con extractos de *A. simplex* presentaron niveles más bajos de sIgE, especialmente aquellos ratones que recibieron el extracto de E/S.

Los niveles más elevados se encontraron en el grupo AC (4.659 ± 726 UA, media \pm ESM) seguido del AC+AK (3.247 ± 702 UA). Aunque también se detectó sIgE en el grupo AC+E/S ($478,4 \pm 581,5$ UA), el nivel fue inferior a los grupos AC y AC+AK ($p < 0,001$ y $p = 0,003$). Cabe destacar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo AC+E/S y el grupo control (Figura 24).

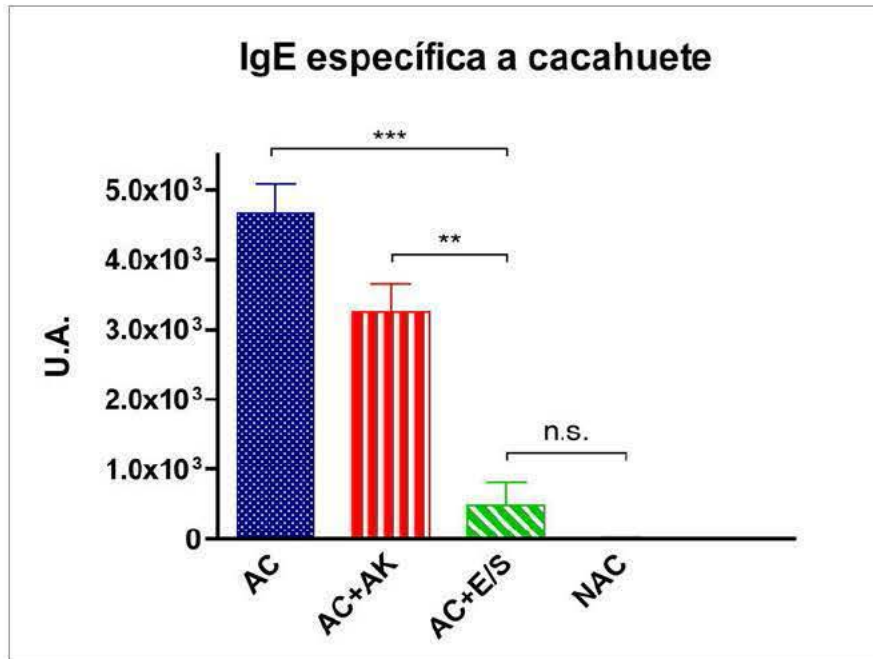


Figura 24. Niveles de IgE específica en grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y el grupo control (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM (** $p < 0,01$); (** $p < 0,001$); (n.s.: no significativo). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

3.2. Los extractos de *Anisakis simplex* reducen la reacción anafiláctica

En la quinta semana, todos los ratones fueron provocados mediante la administración i.p. de 100 μ g de cacahuete. Durante los 30 minutos siguientes, se observaron detenidamente para evaluar los síntomas y se midió la temperatura corporal.

3.2.1. Síntomas de anafilaxia

Los ratones sensibilizados que no recibieron tratamiento presentaron síntomas de anafilaxia grave que iniciaron a los 5 minutos. Los ratones tratados con extractos de *A. simplex*, sufrieron un retraso en el inicio de los síntomas. Los ratones tratados con el E/S presentaron mínimos síntomas a los 20 y 30 minutos postprovocación, manteniendo una puntuación homogénea.

El grupo AC comenzó a presentar la reacción anafiláctica más rápidamente que el resto de grupos y los síntomas fueron agravándose progresivamente. Sin embargo, el grupo AC+E/S presentó síntomas mucho más leves y de inicio más tardío que los grupos AC y AC+AK. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo AC+E/S y los grupos AC y AC+AK desde el minuto 10 (mediana de la puntuación de síntomas 1, 1 y 0 en los grupos AC y AC+AK frente al grupo AC+E/S, respectivamente, $p<0,001$). Las máximas diferencias se encontraron en el minuto 30 (mediana de la puntuación de síntomas 3, 2 y 1 en los grupos AC y AC+AK frente al grupo AC+E/S, $p<0,001$ y $p=0,003$, respectivamente,) (Figura 25).

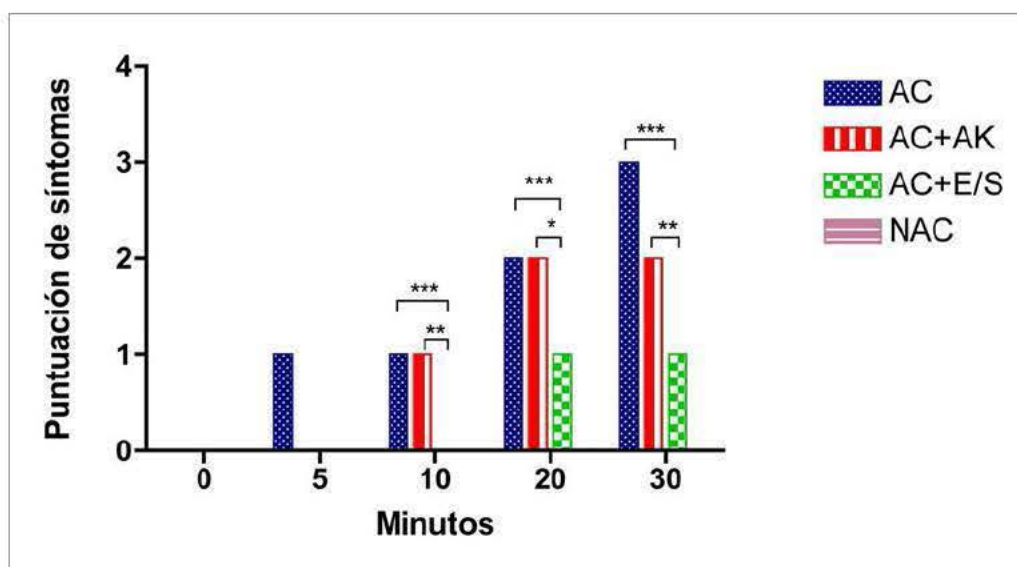


Figura 25. Representación de la mediana de la puntuación de síntomas en los ratones sensibilizados (AC, AC+E/S, AC+AK) y en el grupo control (NAC) (* $p<0,05$); (** $p<0,01$); (** $p<0,001$). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

Para poder estudiar cualitativamente las diferencias encontradas tras el pretratamiento en los tres grupos, se aplicó el algoritmo de las K-medias. Con este test se intentó agrupar los individuos con comportamientos similares y

distinguirlos de los otros individuos, es decir, se quería estudiar si los grupos AC, AC+AK Y AC+E/S habrían tenido comportamientos diferentes. Este estudio estadístico mostró que el grupo AC+E/S era claramente diferente de los AC o AC+AK. Una vez clasificados, se observó que sólo 1 individuo del grupo AC+E/S había sido mal clasificado (12,5%) en el grupo AC y no hubo individuos mal clasificados en el grupo AC+E/S (Tabla XIII). Estos datos indican que los individuos del grupo AC+E/S se comportaron de forma completamente diferente que los del grupo AC, independientemente del momento en el que la puntuación clínica fuera medida.

AC frente a AC+AK		AC frente a AC+E/S	
Bien clasificados en Grupo AC	75%	Bien clasificados en Grupo AC	87,5%
Bien clasificados en Grupo AC+AK	66,7%	Bien clasificados en Grupo AC+E/S	100,0%

Tabla XIII. Resultado del algoritmo de cluster de las K-medias aplicado a la puntuación de síntomas. Se observa como los individuos son claramente mejor clasificados al comparar el grupo AC frente a AC+E/S.

3.2.2. Temperatura corporal

Los ratones sensibilizados sin pretratamiento presentaron síntomas de anafilaxia y sufrieron un descenso brusco de su temperatura corporal. El pretratamiento con extracto somático AK redujo los síntomas anafilácticos y el extracto E/S previno totalmente la reacción.

Los grupos AC, AC+AK presentaron síntomas de anafilaxia y sufrieron un descenso importante de la temperatura corporal desde el minuto 10 (caída de la temperatura de 0,61°C y 0,35°C, $p=0,053$ y $p=0,03$, respectivamente) (Tabla XIV). El descenso de la temperatura fue progresivo durante la provocación encontrándose el mayor descenso en el minuto 30: el grupo AC mostró un

descenso de 6,54°C ($p<0,001$), mientras que en el grupo AC+AK fue de 4,42°C ($p<0,001$). Sin embargo y de forma similar a lo observado en el grupo control, el grupo AC+E/S no sufrió variaciones significativas en su temperatura corporal durante la provocación, siendo el mayor descenso de 0,72°C a los 30 minutos (Figura 26).

Descenso de la temperatura corporal (°C) (%)				
Minutos	AC	AC+AK	AC+E/S	NAC
5	-0,22°C (-0,57%)	0°C (0%)	0°C (0%)	0°C (0%)
10	-0,62°C (-1,59%)	-0,36°C (-0,92%)	0°C (0%)	0°C (0%)
20	-3,16°C (-8,14%)	-2,65°C (-6,82%)	-0,28°C (-0,73%)	0°C (0%)
30	-6,54°C (16,86%)	-4,42°C (-11,36%)	-0,72°C (-1,84%)	0°C (0%)

Tabla XIV. Porcentaje de descenso de la temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los ratones sensibilizados sin tratamiento y los que recibieron tratamiento con extracto somático de *A. simplex* (AC+AK), extracto de excreción/secreción de *A. simplex* (AC+E/S)

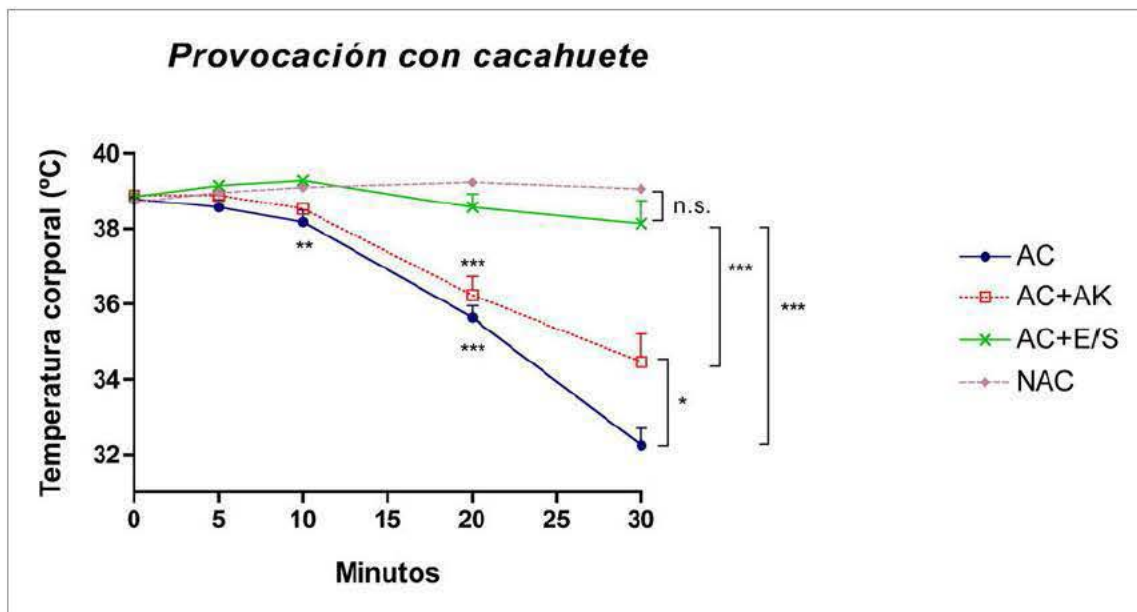


Figura 26. Temperatura corporal tras la provocación con cacahuete en los grupos sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y en el grupo control (NAC). (* $p<0,05$); (** $p<0,01$); (** $p<0,001$). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

3.2.3. Niveles de histamina

En un grupo paralelo de ratones, se midieron en ambas cepas los niveles de histamina plasmática 15 minutos después de la provocación con cacahuete. Todos los ratones sensibilizados liberaron histamina. Sin embargo, se observó cómo los ratones que recibieron pretratamiento con los extractos de *A. simplex* presentaban niveles más bajos de histamina, especialmente el grupo que recibió tratamiento con el extracto E/S donde la liberación de histamina fue mínima.

Los niveles de histamina en los ratones AC ($911,8 \pm 483,2$ nMolar) fueron más elevados que en el grupo AC+AK ($308,4 \pm 178,05$ nMolar) y que en el grupo AC+E/S ($47,8 \pm 17,5$ nMolar, $p=0,023$). Además, los niveles del grupo AC+E/S fueron prácticamente similares al grupo NAC ($30 \pm 9,7$ nMolar), lo que concuerda con los síntomas clínicos observados (Figura 27).

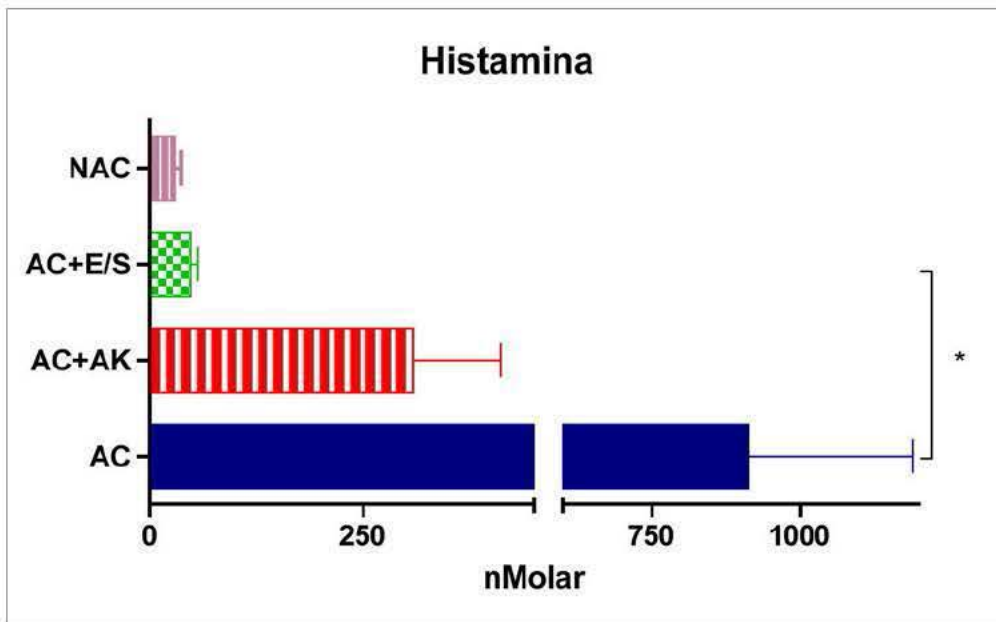


Figura 27. Niveles de histamina plasmática liberada 15 minutos después de la provocación con cacahuete en ratones sensibilizados (AC, AC+AK, AC+E/S) y no sensibilizados (NAC). Los resultados se expresan como la media \pm ESM. (* $p<0,05$). AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

3.3. Los extractos de *Anisakis simplex* modifican el perfil de citocinas

Tras la provocación con cacahuete, todos los ratones fueron sacrificados y se midieron las citocinas liberadas por los esplenocitos, después de ser estimulados con extracto de cacahuete. Se midieron las citocinas inductoras de respuestas de tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13), de tipo 1 (IFN- γ e IL-12) y una citocina reguladora (IL-10) en ambas cepas. En general, todos los ratones sensibilizados demostraron un patrón mixto Th2, Th1 e IL-10.

Los niveles de IL-4 e IL-13 fueron similares en los grupos de ratones sensibilizados. Sin embargo, los ratones del grupo AC+E/S liberaron significativamente menor cantidad de IL-5 que los ratones de los grupos AC y AC+AK (29 ± 29 pg/ml frente a 192 ± 56 pg/ml y 195 ± 90 pg/ml, $p=0,006$ y $p=0,005$, respectivamente) (Figura 28A, B, C).

Todos los grupos sensibilizados liberaron IFN- γ . Los niveles más elevados correspondieron al grupo AC+E/S (483 ± 330 pg/ml) aunque sin encontrar diferencias significativas con los grupos AC y AC+AK ($93,5 \pm 26,9$ pg/ml y $264,5 \pm 262,5$ pg/ml, respectivamente) (Figura 28D).

Además, se detectaron niveles de la citocina reguladora IL-10 en todos los grupos sensibilizados. Cabe destacar los niveles de IL-10 en el grupo AC+E/S (1.332 ± 620 pg/ml) fueron superiores a los niveles de los grupos AC y AC+AK (617 ± 228 pg/ml y 733 ± 698 pg/ml respectivamente), sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos (Figura 28E). Los ratios IFN- γ /IL-5 e IL-10/IL-5 se incrementaron en los grupos tratados con *A. simplex*. En el grupo control, no se encontraron citocinas liberadas por los esplenocitos estimulados.

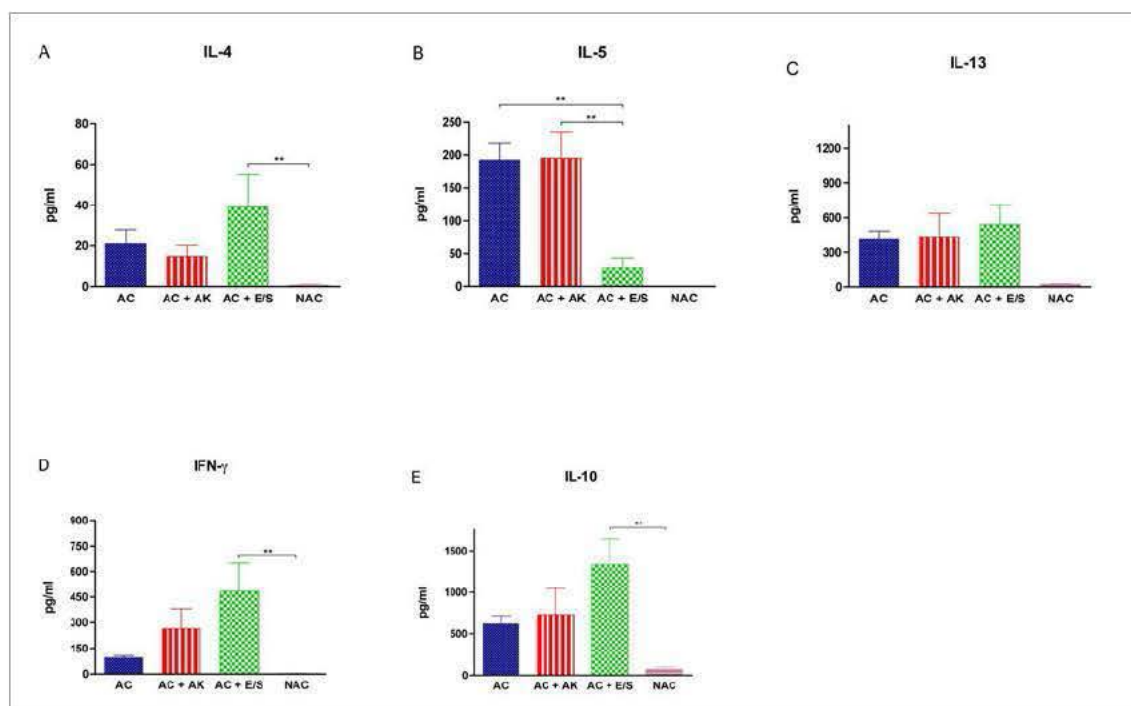


Figura 28. Citocinas (A: IL-4; B: IL-5; C: IL-13; D: IFN- γ ; E: IL-10) producidas por los esplenocitos estimulados con cacahuete. AC: sensibilizados no tratados; AC+AK: tratados con antígeno somático; AC+ES: tratados con E/S; NAC: no sensibilizados.

En resumen, se presenta el desarrollo de un modelo murino de anafilaxia. En primer lugar se comparó la respuesta anafiláctica de dos cepas de ratón, C3H/HeOuJ y BALB/c, sensibilizadas a cacahuete. En ambas cepas, la generación de IgG e IgE específica demuestran la sensibilización de los ratones tras el protocolo aplicado. Los ratones C3H/HeOuJ presentaron niveles progresiva y significativamente más altos de Ig anafilácticas a cacahuete que el mismo grupo de los ratones BALB/c. Tras la provocación con extracto de cacahuete, se objetivaron síntomas anafilácticos, instaurándose más rápida e intensamente en el grupo de ratones C3H/HeOuJ. La afectación clínica sistémica en este grupo fue mayor que en su homólogo de los BALB/c y se acompañó de un descenso más significativo de la temperatura y de una mayor liberación de histamina plasmática tras la provocación demostrando una reacción anafiláctica más grave. Contrariamente, aunque ambas cepas desarrollan citocinas Th1, Th2 y Treg, los niveles son muy

superiores en el grupo de ratones sensibilizados BALB/c. Además, en el aumento de la respuesta linfocitaria en los ratones BALB/c, el patrón encontrado sugiere una activación mixta Th1 y Th2.

La selección de la cepa se realizó por la evidencia de mayor gravedad en la respuesta anafiláctica y humoral de la cepa.

A continuación, se compararon distintas dosis de cacahuete empleadas en la sensibilización de los ratones C3H/HeOuj. Tras la provocación con cacahuete, se objetivaron síntomas anafilácticos, de aparición más precoz y grave en el grupo de ratones en los que se emplean dosis de 100 µg. Además, esta afectación sistémica fue más grave en este grupo. Por ello, se estableció esta dosis como la idónea para los estudios siguientes.

En último lugar, se compararon los efectos de un pretratamiento con los extractos del *Anisakis simplex*, tanto el antígeno somático como el de excreción/secreción, sobre el modelo de anafilaxia. En ambos casos, la sensibilización desarrollada fue inferior al grupo no pretratado, encontrando niveles de IgG1 e IgE específica significativamente menores. los niveles de IgG2a específica fueron mayores en el grupo que recibió el extracto E/S. Tras la provocación con cacahuete, los ratones que recibieron extractos de *A. simplex* presentaron síntomas anafilácticos de menor intensidad y de inicio más tardío, destacando la gran potencia de las proteínas secretadas por el parásito. Por último, ambos grupos desarrollan citocinas que demuestran un patrón mixto. En los grupos pretratados, destacó especialmente la inhibición de la IL-5 producido por el pretratamiento con el E/S, además del incremento de IFN-γ e IL-10 sugiriendo una posible modulación de la respuesta alérgica Th2/Th1.

Discusión

1. Necesidad del desarrollo del modelo de anafilaxia

La anafilaxia es una reacción grave, sistémica, con compromiso vital y potencial desenlace fatal (1) cuya incidencia está aumentando en los últimos años en los países industrializados. En la Unión Europea, se estima que afecta a 1 de cada 300 individuos en algún momento de su vida, produciendo el 0,1% de los ingresos en Urgencias en niños y el 0,3% en los adultos (4, 5). El estudio de la anafilaxia en el hombre es muy complejo (6) por lo que cada vez se emplean más los modelos murinos (10) que permiten reflejar dicha patología y ahondar en los mecanismos inmunológicos subyacentes (8, 9).

El cacahuete es un alimento presente en muchas recetas culinarias de la cocina mediterránea. Desafortunadamente, el cacahuete es un alimento muy alergénico. De hecho, la alergia al cacahuete es la principal causa de muerte por anafilaxia por alimentos (41) y su prevalencia también está en aumento en los países industrializados, estimándose que afecta al 2% de los niños en estos países (42). Desde un punto de vista alergológico, el cacahuete ha sido considerado uno de los mejores alérgenos para analizar los mecanismos inmunológicos en las reacciones anafilácticas ya que contiene epítomos de linfocitos B y T y puede activar directivamente las células presentadoras de antígenos (132) y el complemento (49).

Los estudios dirigidos a valorar el tratamiento y/o la prevención de la anafilaxia son extremadamente peligrosos en el hombre y, por tanto, el modelo

murino debe ser la primera aproximación al desarrollo de nuevos fármacos. Los parásitos han demostrado

La anafilaxia se ha estudiado utilizando cepas de ratón muy diferentes (12, 15, 21, 27-32, 35). Sin embargo, hay pocos estudios que comparen las cepas entre sí y en ellos se demuestra que la reacción inmunológica se presenta de forma diferente. En la literatura se encuentran estudios de anafilaxia realizados en las cepas BALB/c y C3H/HeOJ. Sin embargo, las diferencias en sus respuestas nunca se han comparado en un modelo de anafilaxia sistémica inducido por vía intraperitoneal.

2. Desarrollo del modelo de anafilaxia sistémica

2.1. Consideraciones sobre la sensibilización en este modelo

2.1.1. Protocolos de sensibilización y provocación

En el modelo elegido, se empleó la vía intraperitoneal como vía de sensibilización y provocación para obtener signos muy claros de anafilaxia y que la respuesta clínica desencadenada se asemejara lo máximo posible al hombre (133). En la vía de sensibilización intraperitoneal ya que se ha asociado con una mayor producción de IgE específica (133).

Strait y cols. (134) demuestran la necesidad de que los alérgenos sean absorbidos de forma sistémica para inducir una respuesta alérgica clara, incluso en aquellos modelos murinos en los que la provocación se realiza por vía oral. Observan también como la provocación por vía sistémica induce una reacción anafiláctica más grave que aquella inducida por vía oral. Postulan que la mayor gravedad de síntomas se asocia al rápido inicio de los niveles plasmáticos de

antígeno o bien al pico de máxima concentración de éste, independientemente del tiempo que esas altas concentraciones puedan persistir en el torrente sanguíneo.

Además, varios autores han observado como es necesaria la provocación por vía sistémica en la cepa BALB/c ya que, en algunos modelos la provocación por vía oral, no induce síntomas anafilácticos objetivables (19, 38).

2.1.2. Número de dosis de antígeno administradas

Es importante tener en cuenta el número de dosis de antígeno administradas durante el periodo de sensibilización, ya que parece que el nivel de IgE, IgG1 e IgG2a específicas producidas y la gravedad de los síntomas anafilácticos, se relacionan con el número de dosis recibidas durante el periodo de sensibilización, más que con la cantidad total de antígeno administrada (135). Por ello y junto con las observaciones previas de otros modelos (39, 136) que indicaban que la administración de 3 dosis de antígeno con un intervalo semanal entre ellas inducía una respuesta inmune humoral, celular y clínica óptima para el estudio de la respuesta anafiláctica, se optó por aplicar el mismo procedimiento a este nuevo modelo.

2.1.3. Justificación de los adyuvantes en el modelo

La administración de antígenos purificados resulta poco inmunogénica por la escasa estimulación del sistema inmune innato. Por ello, es necesario añadir adyuvantes a los protocolos de sensibilización para modular la respuesta inmune y poder desencadenar una respuesta alérgica (137). Con frecuencia y sobre todo en los modelos murinos de alergia respiratoria, se ha recurrido al uso del hidróxido de aluminio ya que ha demostrado ser un potente adyuvante pro-Th2 independientemente de la cepa de ratón elegida. Además, ha demostrado su

utilidad en los modelos que buscan el establecimiento de los factores responsables de la inflamación tipo Th2 subyacentes tras las provocaciones con antígenos (138), como el que aquí se presenta. Así, en los ratones BALB/c sensibilizados con un antígeno y el hidróxido de aluminio, se ha demostrado un incremento en los niveles de IgE (139) e IgG1 específica (140). Este efecto se ha relacionado con la capacidad del aluminio de incrementar la presentación del antígeno, aumentándose la captura del mismo por las células dendríticas y activando las células T (141).

De forma similar, se ha descrito que la toxina pertussis (TP) promueve las respuestas Th1 y Th2, observándose un incremento en los niveles de IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-4 e IgG1, IgG2a (142) e IgE específicas (143). También y de forma análoga a lo descrito previamente, la TP potenciaría la presentación de antígenos a través del aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos, células dendríticas, linfocitos B o bien de la producción de citocinas (142).

Un protocolo de sensibilización con adyuvantes, análogo al que aquí se describe, ha sido empleado con éxito en otros modelos murinos de anafilaxia (39, 144). A pesar del uso de adyuvantes en nuestro protocolo, la respuesta inmune en las dos cepas no fue idéntica. Por ello, es altamente probable que existan diferencias genéticas en cada estirpe de ratón que favorezcan distintas respuestas inmunes a los adyuvantes empleados.

Por todo ello, se optó por un modelo de sensibilización por vía intraperitoneal en el que se administraron 3 dosis de cacahuete en presencia de adyuvantes con

una frecuencia semanal y se decidió realizar una provocación sistémica empleando la vía intraperitoneal.

2.1.4. Justificación de la retirada de LPS del extracto de cacahuete

Tanto los ratones C3H/HeO_uJ como los BALB/c tienen receptores tipo Toll 4 (TLR4). En algunos estudios, se ha sospechado que la contaminación de los extractos antígenos con lipopolisácaridos (LPS) podrían interferir en la respuesta inmune. Los LPS son proteínas de la pared externa de las bacterias Gram negativas (145) que pueden activar los TLR presentes en diversas células del sistema inmune innato, induciendo una respuesta Th2, según algunos autores. Sin embargo, existen diferencias a nivel de estos TLR entre las distintas cepas de ratón. Por ello, se ha sugerido que las variaciones observadas en las respuestas alérgicas entre cepas podría ser debido a diferencias en TLR.

Los TLRs son una familia de receptores transmembrana tipo I que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) participando así en la inmunidad innata. El TLR4 se expresa en diversas células del sistema inmune innato, como son los fagocitos mononucleares y las células dendríticas, y es activado por los LPS. La activación del TLR4 aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-12) y moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86)(146). Sin embargo, el papel del LPS en la inducción de una respuesta Th1 o Th2 es controvertido.

En algunos estudios se postula que la activación del TLR4 es necesaria para el desarrollo de una respuesta Th2. Varios autores observan que los ratones C3H/HeJ (deficientes en TLR4 ya que expresan una mutación genética Prolina-Histidina en la posición 712 (147)) presentan una menor respuesta Th2 que los C3H/HeO_uJ

(wild-type, WT) (148). Por el contrario, en otros estudios se observa que el LPS puede inhibir la sensibilización alérgica, encontrando una mayor respuesta Th2 y gravedad en los síntomas anafilácticos en los C3H/HeJ que en los WT (52, 53). Por último, estos autores no encuentran diferencias significativas en la respuesta humoral (IgE e IgG específicas) ni en la gravedad de los síntomas anafilácticos relacionadas con el TLR4.

El papel de TLR4 en el desarrollo de la anafilaxia en la cepa BALB/c también es controvertido. Algunos autores no observan síntomas anafilácticos en los WT ni en los BALB/c deficientes de TLR4 (38), mientras que otros investigadores encuentran una menor respuesta Th2 en los ratones deficientes de TLR4 que en los WT (52). Por último, Khodoun y cols. (49) han demostrado que el extracto de cacahuete es capaz de inducir un shock anafiláctico grave en esta cepa independiente de la contaminación por LPS o la activación del TLR.

Dada la posible interferencia de esta toxina en el estímulo directo de los esplenocitos, se retiró el LPS del extracto de cacahuete en los experimentos que incluyen el estudio del *A. simplex*.

2.2. Comparación de las cepas C3H/HeOul y BALB/c

Al igual que lo observado en nuestro estudio, otros autores corroboran que la sensibilización anafiláctica es dependiente de la cepa, por lo que es esencial conocer las diferencias entre ellas. En la literatura, se encuentran 3 estudios que comparan las mismas cepas que se comparan en el estudio mostrado:

El primero, por Li y cols. (20), utiliza un protocolo de sensibilización intramuscular a través de vacunas de plásmidos en las que incluyen Ara h2

(proteína recombinante de uno de los alérgenos mayoritarios del cacahuete). La provocación se realiza por vía i.p. 3 semanas después. Los autores describen un mayor incremento de los niveles de IgG1 e IgG2a específica a cacahuete en los ratones C3H/HeSn que en los ratones BALB/c, similar a lo descrito en nuestro estudio. Sin embargo, en su estudio, los ratones C3H/HeSn no consiguen estimular la producción de IgE específica a cacahuete y presentan una mayor secreción de citocinas comparado con los ratones BALB/c, a diferencia de lo observado en nuestro estudio.

El segundo, por Morafo y cols. (38), utiliza un protocolo de sensibilización intragástrica (i.g.) con cacahuete y leche de vaca en el que se emplea como adyuvante la toxina colérica (ampliamente usada en estudios de sensibilización por vía oral) y administran dosis de recuerdo semanales. La provocación se realiza por vía i.g. 5 semanas después. De forma análoga a lo descrito en nuestro estudio, los autores encuentran un mayor incremento en los niveles de IgE específica, mayor liberación de histamina plasmática y mayor grado de anafilaxia por puntuación de síntomas en los ratones C3H/HeJ que en los ratones BALB/c con ambos alimentos. También observan que la respuesta alérgica desencadenada se relaciona con niveles más elevados de IL-4 e IL-10 junto con un descenso de los niveles de IFN- γ en los ratones C3H/HeJ. Curiosamente y a diferencia de lo observado en nuestro estudio, los ratones BALB/c, con su protocolo, no presentan ningún síntoma de anafilaxia en la provocación, a pesar de sintetizar IgE específica a ambos alimentos.

En el tercer estudio, por Smit y cols. (19), se utiliza un protocolo de sensibilización i.g. con cacahuete similar al anterior, en el que se comparan las

cepas C3H/HeOuJ, BALB/c y C57BL/6. La provocación se realiza 5 semanas después tanto por vía i.g. como por vía i.p., en 2 experimentos diferentes. En este caso, la sensibilización alérgica inducida es mayor en los ratones BALB/c (comparando los niveles de IgE específica y la liberación de citocinas Th2) que en los ratones C3H/HeOuJ. Sin embargo y de forma análoga a lo observado en nuestro estudio, es la cepa C3H/HeOuJ la que presenta una mayor gravedad de la anafilaxia en la provocación por vía i.p. Curiosamente, en este tercer estudio, tras la provocación por vía i.g. no observan síntomas de anafilaxia ni descenso de la temperatura corporal en el grupo de ratones BALB/c.

Las diferencias entre los estudios son notables. Parte de las diferencias observadas pueden ser debidas a las distintas rutas de sensibilización empleadas (oral frente a sistémica) o a la ruta de administración del antígeno en la provocación (oral frente a sistémica), además de la cepa. De ello se deduce la necesidad de estudiar cada protocolo de forma independiente, analizando todas las fases del protocolo y determinando la cepa más conveniente a emplear en cada caso.

En nuestro caso, ambas cepas demostraron ser válidas para la evaluación de la anafilaxia sistémica. Llama la atención que en el estudio aquí mostrado una de las cepas tenga mayor desarrollo de la inmunidad humoral específica. Los C3H/HeOuJ sintetizan mayor cantidad de IgE e IgG1 específicas y demuestran una reacción anafiláctica más potente. Sin embargo, es la cepa BALB/c la que activa con más potencia los linfocitos específicos. Estos mismos hallazgos se han obtenido en otros estudios de anafilaxia (50), demostrándose así que los mecanismos subyacentes en la anafilaxia son más complejos, no pudiendo limitarlos a una alteración en el

equilibrio Th1/Th2. El conocimiento de estas diferencias podría ayudar a elucidar las diferencias halladas en la anafilaxia en el hombre, donde la exposición al mismo antígeno y en las mismas dosis no siempre induce una respuesta inmune similar. La elección de la cepa C3H/HeOuj se debió a que los síntomas anafilácticos eran claramente identificables por lo que podrán dar una medida más acorde con la mejoría o no de los síntomas anafilácticos tras el tratamiento con los extractos de *A. simplex*.

3. Selección del protocolo de anafilaxia. Elección de la dosis de antígeno

La dosis del antígeno es importante en el desarrollo del modelo de anafilaxia. Son varios los estudios en los que se comparan distintas cantidades de antígeno, con el mismo protocolo para comparar la respuesta alérgica desarrollada y así elegir la dosis más adecuada. En el año 1995, Constant y cols. (149) relacionaron las bajas dosis de antígeno con la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia células T helper 2. Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado estos datos.

Chen y cols. (133) desarrollan, en la cepa BALB/c, un protocolo de sensibilización por vía i.p. en el que se inoculan diferentes dosis de ovoalbúmina administradas con el mismo intervalo y muestran como la menor dosis de antígeno induce una mayor producción de IgE e IgG1 específicas. Sin embargo, Yamanishi y cols. (139) empleando un protocolo de sensibilización similar, encuentran que las dosis más altas son las que se relacionan con una mayor síntesis de IgE e IgG1 específicas.

Por otro lado, se describen discrepancias similares en los modelos que incluyen protocolos de sensibilización por vía oral, cuyas dosis habitualmente son más altas que en los protocolos de sensibilización por vía i.p. Van Wijk y cols. (50) muestran

la ausencia de diferencias significativas en la síntesis de IgE e IgG1 específicas, en relación con las diferentes dosis de cacahuete recibidas, mientras que Li y cols. (31) encuentran que empleando dosis análogas de cacahuete son las dosis bajas las que inducen una mayor respuesta alérgica. Una posible explicación a estas diferencias es la frecuencia de la administración de las dosis, ya que en el primer estudio se repiten semanalmente. De esta forma, el efecto “Booster” también pudiera ejercer tener un papel en la sensibilización alérgica.

Dadas estas variaciones en la literatura, se hizo necesario establecer la dosis óptima a emplear en cada protocolo. En nuestro caso y a diferencia de lo descrito previamente, no fue la dosis más alta (250 µg) ni la dosis más baja (50 µg) los que obtuvieron una respuesta anafiláctica más grave. Esta respuesta se encontró con la dosis intermedia de 100 µg y, por ello, se consideró la más adecuada.

4. Tratamientos para la anafilaxia estudiados en modelos murinos

El desarrollo de estos modelos murinos ha permitido indagar en tratamientos para la anafilaxia humana. En modelos de anafilaxia por cacahuete el tratamiento con hierbas chinas es capaz de evitar el desarrollo de la anafilaxia (no presentan síntomas de anafilaxia, no se produce descenso de la temperatura o liberación de histamina, se inhibe la síntesis de IgE específica y disminuye la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13) (32). Los autores observan que este efecto se mantiene al menos 5 semanas tras el tratamiento. Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos Fase II en Estados Unidos empleando esta fórmula como tratamiento en pacientes con alergia a cacahuete, frutos secos, pescados, mariscos y sésamo.

De forma similar, Khodoun y cols. (150) en su modelo murino de anafilaxia sistémica observan que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-FcεRIα,

capaz de unirse específicamente al receptor de alta afinidad de la IgE (FcεRI), protege frente a la anafilaxia en los ratones tratados. Esto se debe a su capacidad de eliminar los basófilos y de internalizar los receptores FcεRI en los mastocitos. Podría ser una vía para encontrar nuevos tratamientos en la anafilaxia.

Se conocen bien los efectos inmunomoduladores de los helmintos y, por ello, se han estudiado como tratamiento en modelos de anafilaxia (33).

5. Inmunomodulación de la respuesta alérgica inducida por parásitos

En los últimos años, los estudios en modelos murinos con infecciones parasitarias han cobrado gran importancia.

5.1. Infección por parásitos vivos en los modelos murinos de anafilaxia

En la literatura, se encuentran tres modelos realizados sobre anafilaxia sistémica en los que se estudia el papel protector de las infecciones parasitarias sobre ellos.

En el primer estudio, realizado por Bashir y cols. (33) emplean un modelo murino de anafilaxia en ratones C3H/HeJ infectados con *Heligmosomoides polygirus*, parásito intestinal específico de ratones. Por un lado, buscan estudiar si los helmintos pueden comportarse como adyuvantes y por otro lado, si las infecciones parasitarias pueden modular la respuesta anafiláctica. Para analizar esta última hipótesis, 5 días después de la inoculación de 200 larvas administradas por vía oral, se induce la sensibilización mediante la administración i.g. de cacahuete y toxina colérica, realizando la provocación posterior 28 días después por vía i.g.. Los autores muestran como el grupo de ratones infectados presenta

una menor gravedad en los síntomas de anafilaxia y una menor liberación de histamina, lo que ponen en relación con los bajos niveles detectados de IgE específica, IL-13 e IL-10. Además, muestran como el tratamiento con anticuerpos específicos capaces de neutralizar la IL-10, elimina la capacidad protectora de los helmintos en su modelo de anafilaxia. De esta forma, corroboran el papel protector de la IL-10 y destacan un papel principal para la IL-13 en su modelo de anafilaxia.

En el segundo estudio, realizado por Mangan y cols. (129) emplean un modelo murino de anafilaxia sistémica y utilizan *Schistosoma mansoni* como tratamiento. En este modelo, inducen la infección por *S. mansoni* a través de la administración de 40 larvas introducidas a través de la piel de un grupo de ratones BALB/c. Para la sensibilización, realizada 7 semanas después de la infección parasitaria, emplean penicilina (Pen-V-OVA) junto con *Bordetella pertussis* e hidróxido de aluminio administrado por vía i.p. Los autores muestran como el grupo infectado con *S. mansoni* presentan una mayor protección frente a la anafilaxia exhibiendo un menor descenso de la temperatura corporal y una menor liberación de histamina y MMCP-1. Además, este grupo de ratones infectados presenta niveles más elevados de IL-10 y TGF- β . Al inducir el bloqueo de IL-10 con el anticuerpo específico anti-IL-10R, observan como en ausencia de esta citocina, se produce la caída de la temperatura corporal en estos ratones, restaurándose la reacción anafiláctica, mientras que la temperatura corporal no se altera con la ausencia de TGF- β . De esta forma, sugieren que la resistencia a la anafilaxia inducida por *S. mansoni* se debe al papel de la IL-10. A continuación, intentan establecer el origen de esa IL-10, administrando un anticuerpo específico anti-IgM para la depleción de células B, observando que estos ratones vuelven otra vez a presentar síntomas de anafilaxia.

Por último, intentan transferir la protección observada a ratones no infectados mediante la administración de células B purificadas. Sorprendentemente, encuentran que estos ratones lejos de estar protegidos sufren una caída de la temperatura corporal más intensa, con aumento de la mortalidad en ese grupo. Esto lo explican porque las células B liberaban también IL-4, que sería la responsable del empeoramiento de la respuesta anafiláctica. La transferencia de células B provenientes de ratones deficientes de IL-4 sin embargo protegían de la anafilaxia en los ratones no infectados. De esta forma, muestran como la infección con *S. mansoni*, administrada semanas antes de la sensibilización, es capaz de proteger frente a la anafilaxia y que en el mecanismo por el que se induce esta protección participan las células B y su liberación de IL-10.

En el tercer estudio, Michels y cols. (130) buscan caracterizar la respuesta inmune inducida por la infección por *Syphacia obvelata*, un nematodo gastrointestinal específico de ratones. Además, estudian los efectos de esta infección sobre un modelo de anafilaxia sistémica inducida en ratones BALB/c. Para analizar esta última hipótesis, administran por vía i.p. OVA e hidróxido de aluminio días después de la infección con 500 huevos de *S. obvelata* administrados por vía oral. Para la provocación administran OVA por vía i.v.. Observan como el grupo de ratones infectados presentan un mayor descenso de la temperatura corporal y una menor producción de IL-4 e IL-5, por lo que, los ratones infectados con este parásito, no se encuentran protegidos frente a la anafilaxia.

5.2. Tratamiento con antígenos de excreción/secreción en los modelos murinos de alergia

Utilizar la infección de un parásito para proteger de las reacciones alérgicas es peligroso, ya que para lograr el efecto deseado el número de parásitos necesarios podría ser importante y la duración de la infección larga. Por tanto, los antígenos derivados de helmintos con capacidad de modular la respuesta inmune alérgica se están convirtiendo en una opción prometedora. Entre ellos, destaca el uso de antígenos de excreción/secreción en diferentes estudios (99). En la literatura actual se encuentran 4 estudios sobre los productos de excreción/secreción de distintos parásitos y su papel en la respuesta alérgica.

En el 2007, Trujillo-Vargas y cols. (117) emplean un modelo murino de asma bronquial empleando como tratamiento el E/S de *Nippostrongylus brasiliensis* (NES). En este modelo, inducen la sensibilización mediante la administración i.p. de OVA e Al(OH)₃, en presencia o ausencia de NES. Para la provocación, se administra OVA por vía intranasal. Los autores demuestran como el pretratamiento con NES inhibe el desarrollo de la inflamación aérea, reduce la eosinofilia y la hiperreactividad bronquial, junto con una disminución significativa de los niveles de IL-4 e IL-5 en el lavado broncoalveolar. Además, los niveles séricos de IgG1 e IgE se encuentran significativamente disminuidos. De esta forma, demuestran como la co-administración de NES inhibe el desarrollo de la respuesta Th2 a nivel sistémico y local. También demuestran cómo esta inhibición es independiente de TLR-2, TLR-4, IFN- γ pero depende de IL-10 ya que la administración del anticuerpo específico anti-IL-10 (IL-10R), revierte la protección aportada por NES. Por otro lado, comprueban como la administración de NES

como antígeno es capaz de inducir una respuesta alérgica Th2 encontrando niveles séricos elevados de IgG1 e IgE específicos, IL-5 y eosinofilia a nivel bronquial.

En el 2008, Lee y cols. (125) utilizan un modelo murino de asma bronquial en ratones BALB/c para comprobar la eficacia del tratamiento con el antígeno completo o el E/S de *Toxascaris leonina* (Tl-TP O Tl-ES, respectivamente). En este modelo, la administración de los extractos Tl-ES la realizan por vía i.p. previo a la sensibilización. Días después, realizan la provocación intranasal con OVA. Los autores demuestran como Tl-ES es capaz de inhibir la inflamación aérea y la hiperreactividad bronquial, disminuyendo los niveles de IgG2a, IgG1 e IgE específicas. Además, observan una menor liberación de IL-4 e IL-5 y aumentan los niveles de IL-10, lo que podría sugerir que la inmunomodulación inducida por el E/S de *T. leonina* ocurre a través de esta citocina.

En el 2012, McSorley y cols. (120) emplean un modelo murino de asma bronquial empleando como tratamiento el E/S de *H. polygirus* (HES). En este modelo, inducen la sensibilización mediante la administración i.p. de OVA e Al(OH)₃, mientras que para la provocación emplean aerosoles de OVA al 1% en PBS. La administración del HES la realizan a la vez que las dosis de sensibilización con el antígeno. Los autores observan como el pretratamiento con HES suprime tanto la inflamación alérgica de la vía aérea (en cuanto a número de células totales, eosinófilos y células CD4⁺T-helper que encuentran en el lavado broncoalveolar), como la producción de IgG1 e IgE antígeno-específicas junto con una disminución de la liberación de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A e IFN- γ en el pulmón. Así, muestran como los cambios inducidos en la respuesta Th2 no se debe a un incremento de la respuesta Th1 y tampoco demuestran un papel muy relevante de

la IL-10 por lo que sugieren que deben existir otras vías de protección en este modelo. Por otro lado, encuentran una disminución significativa en los marcadores específicos de MAA (molécula similar a la resistina (RELM α) e Ym1). Dado que estos marcadores son dependientes de la respuesta Th2, postulan que su disminución, junto con el resto de datos encontrados, refleja una supresión de la respuesta Th2 en este modelo. Por último, encuentran que la proporción de linfocitos T efectores (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) activados está claramente disminuidos mientras que no encuentran cambios en la activación de los Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) en el grupo tratado con HES, por lo que el equilibrio T efectores/T reg se inclinaría claramente a favor de estas últimas. A continuación, analizan los cambios producidos con la administración de HES simultánea a la provocación bronquial, 28 días después de la sensibilización y directamente sobre el tejido pulmonar. En este caso, observan como el HES disminuye el número de eosinófilos y los linfocitos CD4⁺ T helper en el tejido pulmonar, los niveles de IL-5 (sin cambios en los de IL-4) y los marcadores específicos de MAA. Sin embargo, no encontraron cambios en el balance de linfocitos T efectores/Treg. De esta forma muestran como la co-administración de HES y el antígeno suprime tanto la respuesta innata como adaptativa y, que si se administra durante la provocación, se suprime la respuesta innata (principalmente, los eosinófilos).

En el 2014, Ebner y cols. (136) estudian el efecto del E/S de *Trichuris suis* (Ts E/S) en un modelo murino de anafilaxia realizado en la cepa BALB/c. La sensibilización la realizan administrando OVA e Al(OH)₃ por vía i.p. junto con las dosis de sensibilización y por la misma vía, administran Ts E/S. La provocación se realiza mediante la administración intranasal de OVA y PBS. De forma similar a lo

descrito previamente, los autores muestran como los ratones tratados presentan menor hiperreactividad bronquial tras la provocación, así como una disminución de las células inflamatorias en el lavado broncoalveolar. Además, observan una disminución importante de los niveles de IgG1 e IgE antígeno-específicas, así como de las IL-4, IL-5 e IL-13 en el lavado broncoalveolar. Sin embargo, en el cultivo de los esplenocitos no hallaron esta disminución de las citocinas por lo que parece que la acción protectora de Ts E/S podría ocurrir localmente en el pulmón. Por último, con respecto a los posibles moduladores, observan un número reducido de MAA en el tejido pulmonar. Además, el tratamiento con el anticuerpo neutralizador del receptor de la IL-10 (aIL-10R), previo a la provocación, suprimió la protección inflamatoria sin restaurar los niveles de IgE antígeno-específicas, por lo que postulan también que la IL-10 es parcialmente responsable de la supresión local de la inflamación aérea en el tratamiento con Ts E/S.

En resumen, hay varios estudios que ya utilizan los antígenos de E/S para regular la anafilaxia y, con ciertas diferencias, parecen justificar esta protección a un aumento del estímulo regulador.

5.3. *Anisakis simplex* y modelos murinos de alergia

El *Anisakis simplex* es un nematodo capaz de actuar como parásito y como alérgeno, por lo que su estudio como posible inmunomodulador en las enfermedades alérgicas resulta muy interesante.

En la literatura se encuentra el estudio realizado por Park y cols. (127) en un modelo murino de asma bronquial, y empleando el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) obtenido del *A. simplex* (As-MIF), factor que pertenece a las proteínas de E/S del parásito. En este modelo inducen la sensibilización de los

ratones BALB/c con OVA e Al(OH)₃ administrada por vía i.p. El tratamiento con distintas concentraciones de As-MIF lo administran posteriormente. La provocación la realizan mediante aerosoles de OVA al 3% en PBS. En las muestras histológicas, observan que el tratamiento con As-MIF reduce significativamente y de forma dosis-dependiente la infiltración de células inflamatorias en la vía aérea. Además se evidencia un adelgazamiento del epitelio bronquial, una reducción del número de células de “globet” y una reducción en la producción de moco en los grupos tratados, siendo más evidente en el grupo que recibió la dosis superior. Además, en el lavado broncoalveolar se observa una disminución importante del número de macrófagos y eosinófilos. También, muestran una disminución en las concentraciones de IL-4, IL-5, IL-13 en el lavado broncoalveolar junto con una reducción de IFN- γ y un aumento significativo de los niveles de TGF- β 1 e IL-10. Por último, el número de células Treg en el lavado broncoalveolar fue significativamente superior. De esta forma, muestran como el tratamiento con As-MIF es capaz de proteger frente al asma bronquial en su modelo murino. Es capaz de ejercer un efecto inmunomodulador e inhibir la reacción alérgica Th2 a través de la producción de las citosina y células reguladoras.

5.4. Extracto de Excreción/Secreción como tratamiento en nuestro modelo murino de anafilaxia

Hasta la fecha, no hay en la literatura otros estudios acerca de los antígenos derivados de helmintos y la anafilaxia sistémica, similares al que se muestra aquí.

En el modelo murino de anafilaxia tratado con el antígeno de E/S del *A. simplex* mostrado, se observa como la administración simultánea del antígeno de E/S junto con el alérgeno, es capaz de proteger y evitar la respuesta anafiláctica. En

individuos que viven en áreas donde la infección por helmintos es endémica la exposición a los parásitos ocurre en las primeras etapas de la vida, e incluso, en el vientre materno. Se ha postulado que el contacto inmunológico con los helmintos debe darse en las primeras etapas de la vida para que demuestren un efecto protector (61). De una forma equivalente, en los estudios murinos en los que la administración del extracto E/S si se realiza de forma simultánea a la sensibilización con el alérgeno, se obtiene una protección del parásito frente a la enfermedad alérgica.

En este estudio, los niveles de IgG1 e IgE específica a cacahuete en los ratones tratados con extractos de *A. simplex* permanecen bajos lo que podría sugerir una alteración del desarrollo de la respuesta alérgica desde el inicio de la sensibilización. También permanecen bajos los niveles de IL-5, lo que se evidencia también en estudios similares que reciben el antígeno parasitario y el alérgeno de forma simultánea (117, 120, 136). Sin embargo, y de forma similar a lo observado en el estudio de Ebner y cols. (136), los niveles de secreción de IL-4, IL-13, IFN- γ , se mantuvieron estables en el cultivo de esplenocitos en estos ratones, por lo que no parece existir desviación clara hacia la vía Th1 o Th2. Por otro lado, y de forma similar a lo observado en el estudio de Park y cols. (127) destacan los altos niveles de IL-10 encontrados en el grupo tratado con E/S, lo que sugiere que la inmunomodulación inducida por el E/S del *A. simplex* podría ocurrir a través de esta ruta.

El efecto del tratamiento de ambos extractos, somático y E/S, es protector, pero claramente más intensos con los antígenos secretados. Es en este grupo de

moléculas donde se espera encontrar el factor específico implicado en esta protección.

Finalmente, se destaca los altos niveles de IgG2a específica en nuestro modelo de anafilaxia que podrían colaborar al efecto protector de la anafilaxia. La IgG2a se correspondería con la IgG4 en el humano. Se ha demostrado como la IgG4 específica no es capaz de inducir la activación de basófilos y mastocitos. De esta forma, la IgG4 podría ser un marcador de la vía Th2 modificada (61) y tener un papel importante en el modelo de anafilaxia aquí presentado.

En conclusión, se presenta un modelo de anafilaxia en el ratón que se ha podido utilizar para demostrar la capacidad protectora de los antígenos secretados por el *Anisakis simplex* y que podrían tener aplicaciones futuras.

Conclusiones

- Las cepas C3H/HeOuj y BALB/c son ambas idóneas para el estudio de la anafilaxia sistémica, siendo la primera más adecuada para la evaluación de la respuesta clínica, idóneamente con 100 µg por dosis y 3 dosis de extracto.
- Los antígenos parasitarios del *Anisakis simplex* somáticos y, fundamentalmente, los de excreción/secreción, tienen un efecto protector de la respuesta anafiláctica.
- Los antígenos de *Anisakis simplex* ejercen un efecto inmunomodulador a nivel humoral y celular.

Referencias

1. Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilo MB, Brockow K, Fernandez Rivas M, et al. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 2014;69(8):1026-45.
2. Richet C. De l'anaphylaxie ou sensibilité croissante des organismes à des doses successives de poison. *Arch Fisiol*. 1904;1:129-42.
3. Lieberman P. Epidemiology of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(4):316-20.
4. Panesar SS, Javad S, de Silva D, Nwaru BI, Hickstein L, Muraro A, et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy*. 2013;68(11):1353-61.
5. Alvarez-Perea A, Tomas-Perez M, Martinez-Lezcano P, Marco G, Perez D, Zubeldia JM, et al. Anaphylaxis in Adolescent/Adult Patients Treated in the Emergency Department: Differences Between Initial Impressions and the Definitive Diagnosis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(4):288-94.
6. Brown SG, Stone SF, Fatovich DM, Burrows SA, Holdgate A, Celenza A, et al. Anaphylaxis: clinical patterns, mediator release, and severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(5):1141-9 e5.
7. Castells MC. Anaphylaxis and hypersensitivity reactions. New York: Humana Press : Springer; 2011. xiii, 361 p. p.33-43
8. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*. 2005;175(1):5-14.
9. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunology today*. 1991;12(8):256-7.
10. Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):309-17.

11. Weiser R. Studies on anaphylaxis in the mouse. *J Infect Dis.* 1941;68(2):97-112.
12. Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(3):506-15; quiz 16-7.
13. Triggiani M, Patella V, Staiano RI, Granata F, Marone G. Allergy and the cardiovascular system. *Clin Exp Immunol.* 2008;153 Suppl 1:7-11.
14. Finkelman FD, Scher I, Mond JJ, Kessler S, Kung JT, Metcalf ES. Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD. II. Generation of polyclonal antibody production and cells with surface IgG. *J Immunol.* 1982;129(2):638-46.
15. Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(4):658-68.
16. Arias K, Chu DK, Flader K, Botelho F, Walker T, Arias N, et al. Distinct immune effector pathways contribute to the full expression of peanut-induced anaphylactic reactions in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1552-61 e1.
17. Osterfeld H, Ahrens R, Strait R, Finkelman FD, Renauld JC, Hogan SP. Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):469-76 e2.
18. Baeza ML, Zubeldia JM. Immunology of anaphylaxis: lessons from murine models. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007;7(1):49-55.
19. Smit JJ, Willemsen K, Hassing I, Fiechter D, Storm G, van Bloois L, et al. Contribution of classic and alternative effector pathways in peanut-induced anaphylactic responses. *PLoS One.* 2011;6(12):e28917.
20. Li X, Huang CK, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Kim KH, et al. Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. *J Immunol.* 1999;162(5):3045-52.
21. Arumugam M, Ahrens R, Osterfeld H, Kottyan LC, Shang X, MacLennan JA, et al. Increased susceptibility of 129SvEvBrd mice to IgE-Mast cell mediated anaphylaxis. *BMC Immunol.* 2011;12:14.
22. Akdis CA, Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Allergy.* 2006;61 Suppl 81:11-4.

23. Salari F, Varasteh AR, Vahedi F, Hashemi M, Sankian M. Down-regulation of Th2 immune responses by sublingual administration of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-encapsulated allergen in BALB/c mice. *Int Immunopharmacol*. 2015.
24. Gadermaier E, Staikuniene J, Scheiblhofer S, Thalhamer J, Kundi M, Westritschnig K, et al. Recombinant allergen-based monitoring of antibody responses during injection grass pollen immunotherapy and after 5 years of discontinuation. *Allergy*. 2011;66(9):1174-82.
25. van Rijt LS, Gouveia L, Logiantara A, Canbaz D, Opstelten DJ, van der Kleij HP, et al. Birch pollen immunotherapy in mice: inhibition of Th2 inflammation is not sufficient to decrease airway hyper-reactivity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;165(2):128-39.
26. Jutel M, Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2011;66(6):725-32.
27. Waeckerle-Men Y, Liang Y, von Moos S, Kundig TM, Johansen P. Multivalent paediatric allergy vaccines protect against allergic anaphylaxis in mice. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(3):429-37.
28. Strid J, Thomson M, Hourihane J, Kimber I, Strobel S. A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. *Immunology*. 2004;113(3):293-303.
29. Sun J, Arias K, Alvarez D, Fattouh R, Walker T, Goncharova S, et al. Impact of CD40 ligand, B cells, and mast cells in peanut-induced anaphylactic responses. *J Immunol*. 2007;179(10):6696-703.
30. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1484-96.
31. Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(1 Pt 1):150-8.
32. Srivastava KD, Kattan JD, Zou ZM, Li JH, Zhang L, Wallenstein S, et al. The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):171-8.

33. Bashir ME, Andersen P, Fuss IJ, Shi HN, Nagler-Anderson C. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J Immunol.* 2002;169(6):3284-92.
34. Nagler-Anderson C, Charlestown M. *Parasites in allergy.* Basel (Switzerland): Karger; 2006.1-11
35. Zhu D, Kepley CL, Zhang M, Zhang K, Saxon A. A novel human immunoglobulin Fc gamma Fc epsilon bifunctional fusion protein inhibits Fc epsilon RI-mediated degranulation. *Nat Med.* 2002;8(5):518-21.
36. Li XM, Schofield BH, Wang QF, Kim KH, Huang SK. Induction of pulmonary allergic responses by antigen-specific Th2 cells. *J Immunol.* 1998;160(3):1378-84.
37. Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM. Acute inhibition of nitric oxide exacerbates airway hyperresponsiveness, eosinophilia and C-C chemokine generation in a murine model of fungal asthma. *Inflamm Res.* 2000;49(6):297-304.
38. Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(5):1122-8.
39. Baeza ML, Conejero L, Higaki Y, Martin E, Perez C, Infante S, et al. *Anisakis simplex* allergy: a murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(3):433-40.
40. Al-Ahmed N, Alsowaidi S, Vadas P. Peanut allergy: an overview. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2008;4(4):139-43.
41. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6):1203-7.
42. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):291-307; quiz 8.
43. Santos AF, Du Toit G, Douiri A, Radulovic S, Stephens A, Turcanu V, et al. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(1):179-86.

44. Burks AW, Wood RA, Jones SM, Sicherer SH, Fleischer DM, Scurlock AM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Long-term follow-up of a randomized multicenter trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1240-8 e1-3.
45. Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Plaut M, Bahnson HT, Mitchell H, et al. Identifying infants at high risk of peanut allergy: the Learning Early About Peanut Allergy (LEAP) screening study. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):135-43 e1-12.
46. Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, et al. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J Immunol*. 2000;164(11):5844-9.
47. Sen M, Kopper R, Pons L, Abraham EC, Burks AW, Bannon GA. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J Immunol*. 2002;169(2):882-7.
48. Shreffler WG, Castro RR, Kucuk ZY, Charlop-Powers Z, Grishina G, Yoo S, et al. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *J Immunol*. 2006;177(6):3677-85.
49. Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Karasuyama H, Herbert DR, et al. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(2):342-51.
50. van Wijk F, Hartgring S, Koppelman SJ, Pieters R, Knippels LM. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(9):1422-8.
51. van Wijk F, Hoeks S, Nierkens S, Koppelman SJ, van Kooten P, Boon L, et al. CTLA-4 signaling regulates the intensity of hypersensitivity responses to food antigens, but is not decisive in the induction of sensitization. *J Immunol*. 2005;174(1):174-9.
52. Berin MC, Zheng Y, Domaradzki M, Li XM, Sampson HA. Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. *Allergy*. 2006;61(1):64-71.
53. Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol*. 2004;172(11):6978-87.

54. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 6a ed. Ámsterdam ; Barcelona etc.: Elsevier; 2009. X, 947 p. p.65-73
55. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2009;9(1):29-37.
56. Babu S, Bhat SQ, Pavan Kumar N, Lipira AB, Kumar S, Karthik C, et al. Filarial lymphedema is characterized by antigen-specific Th1 and th17 proinflammatory responses and a lack of regulatory T cells. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4):e420.
57. McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. Int J Parasitol. 2013;43(3-4):301-10.
58. Maizels RM, McSorley HJ, Smyth DJ. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? Clin Exp Immunol. 2014;177(1):38-46.
59. Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. Nature reviews Immunology. 2007;7(3):220-30.
60. Nutman TB. Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. Parasite Immunol. 2015;37(6):304-13.
61. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. Clinical microbiology reviews. 2012;25(4):585-608.
62. Talaat KR, Bonawitz RE, Domenech P, Nutman TB. Preexposure to live *Brugia malayi* microfilariae alters the innate response of human dendritic cells to *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 2006;193(2):196-204.
63. Gause WC, Urban JF, Jr., Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. Trends in immunology. 2003;24(5):269-77.
64. ; Available from: http://www.phsource.us/PH/HELM/helminth_taxo.htm.
65. Cuomo MJN LB, White DB. Diagnosing medical parasites: a public health officers guide to assisting laboratory and medical officers. 2012.120-123
66. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. *Anisakis*--a food-borne parasite that triggers allergic host defences. Int J Parasitol. 2013;43(12-13):1047-57.

67. Baeza Ochoa de Ocaríz ML. HIPERSENSIBILIDAD A ANISAKIS SIMPLEX: Aspectos epidemiológicos, clínicos y patogénicos. Tesis doctoral. 2005:10.
68. Van T. Anisakiasis. Acta Leidensia. 1964;33:203.
69. Chai JY, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. Int J Parasitol. 2005;35(11-12):1233-54.
70. Yorimitsu N, Hiraoka A, Utsunomiya H, Imai Y, Tatsukawa H, Tazuya N, et al. Colonic intussusception caused by anisakiasis: a case report and review of the literature. Intern Med. 2013;52(2):223-6.
71. Baird FJ, Gasser RB, Jabbar A, Lopata AL. Foodborne anisakiasis and allergy. Mol Cell Probes. 2014;28(4):167-74.
72. Daschner A, Alonso-Gomez A, Cabanas R, Suarez-de-Parga JM, Lopez-Serrano MC. Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol. 2000;105(1 Pt 1):176-81.
73. Baeza ML, Rodriguez A, Matheu V, Rubio M, Tornero P, de Barrio M, et al. Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. Clin Exp Allergy. 2004;34(2):296-302.
74. Alonso-Gomez A, Moreno-Ancillo A, Lopez-Serrano MC, Suarez-de-Parga JM, Daschner A, Caballero MT, et al. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. Parasitol Res. 2004;93(5):378-84.
75. Daschner A, Cuellar C. The hidden sense of symptoms: urticaria can be beneficial. Med Hypotheses. 2010;75(6):623-6.
76. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989;299(6710):1259-60.
77. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. Int Arch Allergy Immunol. 1992;98(4):279-85.

78. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax*. 2000;55 Suppl 1:S2-10.
79. Stene LC, Nafstad P. Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet*. 2001;357(9256):607-8.
80. Rook GA. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*. 2009;126(1):3-11.
81. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebeñigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet*. 2001;358(9292):1493-9.
82. Supali T, Djuardi Y, Wibowo H, van Ree R, Yazdanbakhsh M, Sartono E. Relationship between different species of helminths and atopy: a study in a population living in helminth-endemic area in Sulawesi, Indonesia. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(4):388-94.
83. Rujeni N, Nausch N, Bourke CD, Midzi N, Mduluza T, Taylor DW, et al. Atopy is inversely related to schistosome infection intensity: a comparative study in Zimbabwean villages with distinct levels of *Schistosoma haematobium* infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158(3):288-98.
84. Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(3):404-11.
85. Borkow G, Leng Q, Weisman Z, Stein M, Galai N, Kalinkovich A, et al. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *J Clin Invest*. 2000;106(8):1053-60.
86. van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YC, Souverijn JH, et al. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis*. 2004;189(5):892-900.
87. Vereecken K, Kanobana K, Wordemann M, Junco Diaz R, Menocal Heredia L, Ruiz Espinosa A, et al. Associations between atopic markers in asthma and intestinal helminth infections in Cuban schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(4):332-8.

88. Takeuchi H, Zaman K, Takahashi J, Yunus M, Chowdhury HR, Arifeen SE, et al. High titre of anti-*Ascaris* immunoglobulin E associated with bronchial asthma symptoms in 5-year-old rural Bangladeshi children. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(2):276-82.
89. Schabussova I, Wiedermann U. Allergy and worms: let's bring back old friends? *Wien Med Wochenschr*. 2014;164(19-20):382-91.
90. Amoah AS, Boakye DA, van Ree R, Yazdanbakhsh M. Parasitic worms and allergies in childhood: insights from population studies 2008-2013. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(3):208-17.
91. Weinstock JV. Do We Need Worms to Promote Immune Health? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014.
92. Sitcharungsi R, Sirivichayakul C. Allergic diseases and helminth infections. *Pathogens and global health*. 2013;107(3):110-5.
93. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002;296(5567):490-4.
94. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(5):514-23.
95. Feary J, Britton J, Leonardi-Bee J. Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2011;66(4):569-78.
96. Pandiyan P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3(+) regulatory T cells. *Cytokine*. 2015;76(1):13-24.
97. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-98.
98. Orihara K, Nakae S, Pawankar R, Saito H. Role of regulatory and proinflammatory T-cell populations in allergic diseases. *World Allergy Organ J*. 2008;1(1):9-14.
99. Shepherd C, Navarro S, Wangchuk P, Wilson D, Daly NL, Loukas A. Identifying the immunomodulatory components of helminths. *Parasite Immunol*. 2015;37(6):293-303.

100. Evans H, Mitre E. Worms as therapeutic agents for allergy and asthma: understanding why benefits in animal studies have not translated into clinical success. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):343-53.
101. Pinto LA, Pitrez PM, Fontoura GR, Machado DC, Jones MH, Graeff-Teixeira C, et al. Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. *Parasite Immunol*. 2004;26(3):151-5.
102. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol*. 2006;177(3):1628-35.
103. Wilson MS, Taylor MD, O'Gorman MT, Balic A, Barr TA, Filbey K, et al. Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur J Immunol*. 2010;40(6):1682-96.
104. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005;202(9):1199-212.
105. Hartmann S, Schnoeller C, Dahten A, Avagyan A, Rausch S, Lendner M, et al. Gastrointestinal nematode infection interferes with experimental allergic airway inflammation but not atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(10):1585-96.
106. Mo HM, Lei JH, Jiang ZW, Wang CZ, Cheng YL, Li YL, et al. *Schistosoma japonicum* infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation in mice. *Parasitol Res*. 2008;103(5):1183-9.
107. Liu P, Li J, Yang X, Shen Y, Zhu Y, Wang S, et al. Helminth infection inhibits airway allergic reaction and dendritic cells are involved in the modulation process. *Parasite Immunol*. 2010;32(1):57-66.
108. Liu JY, Li LY, Yang XZ, Li J, Zhong G, Wang J, et al. Adoptive transfer of dendritic cells isolated from helminth-infected mice enhanced T regulatory cell responses in airway allergic inflammation. *Parasite Immunol*. 2011;33(10):525-34.
109. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1114-24 e8.

110. Mangan NE, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2006;176(1):138-47.
111. Layland LE, Straubinger K, Ritter M, Loffredo-Verde E, Garn H, Sparwasser T, et al. *Schistosoma mansoni*-mediated suppression of allergic airway inflammation requires patency and Foxp3⁺ Treg cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2379.
112. Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, Soullie T, Willart MA, Lievers E, et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):932-40.
113. Wang CC, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(3):495-503.
114. Park HK, Cho MK, Choi SH, Kim YS, Yu HS. *Trichinella spiralis*: infection reduces airway allergic inflammation in mice. *Exp Parasitol*. 2011;127(2):539-44.
115. Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, Avagyan A, Wittig BM, Loddenkemper C, et al. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J Immunol*. 2008;180(6):4265-72.
116. Jeong YI, Kim SH, Ju JW, Cho SH, Lee WJ, Park JW, et al. *Clonorchis sinensis*-derived total protein attenuates airway inflammation in murine asthma model by inducing regulatory T cells and modulating dendritic cell functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(4):793-800.
117. Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):336-44.
118. Lima C, Perini A, Garcia ML, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(11):1659-66.
119. McConchie BW, Norris HH, Bundoc VG, Trivedi S, Boesen A, Urban JF, Jr., et al. *Ascaris suum*-derived products suppress mucosal allergic inflammation in an interleukin-10-independent manner via interference with dendritic cell function. *Infect Immun*. 2006;74(12):6632-41.

120. McSorley HJ, O'Gorman MT, Blair N, Sutherland TE, Filbey KJ, Maizels RM. Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Eur J Immunol*. 2012;42(10):2667-82.
121. McSorley HJ, Blair NF, Smith KA, McKenzie AN, Maizels RM. Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. *Mucosal Immunol*. 2014;7(5):1068-78.
122. Yang J, Zhao J, Yang Y, Zhang L, Yang X, Zhu X, et al. *Schistosoma japonicum* egg antigens stimulate CD4⁺ CD25⁺ T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology*. 2007;120(1):8-18.
123. Pacifico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun*. 2009;77(1):98-107.
124. Cardoso LS, Oliveira SC, Goes AM, Oliveira RR, Pacifico LG, Marinho FV, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2010;160(2):266-74.
125. Lee KH, Park HK, Jeong HJ, Park SK, Lee SJ, Choi SH, et al. Immunization of proteins from *Toxascaris leonina* adult worm inhibits allergic specific Th2 response. *Veterinary parasitology*. 2008;156(3-4):216-25.
126. Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Gremmer E, van Loveren H. Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(4):649-58.
127. Park SK, Cho MK, Park HK, Lee KH, Lee SJ, Choi SH, et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of *Anisakis simplex* suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell recruitment. *J Immunol*. 2009;182(11):6907-14.
128. Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol*. 2004;16(4):585-96.
129. Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol*. 2004;173(10):6346-56.

130. Michels C, Goyal P, Nieuwenhuizen N, Brombacher F. Infection with *Syphacia obvelata* (pinworm) induces protective Th2 immune responses and influences ovalbumin-induced allergic reactions. *Infect Immun*. 2006;74(10):5926-32.
131. Xu W, Tamura T, Takatsu K. CpG ODN mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cell pathway. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(2):351-61.
132. Berin MC. Pathogenesis of IgE-mediated food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(10):1483-96.
133. Chen C, Sun N, Li Y, Jia X. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food Chem Toxicol*. 2013;62:41-7.
134. Strait RT, Mahler A, Hogan S, Khodoun M, Shibuya A, Finkelman FD. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(4):982-9 e1.
135. Nelde A, Teufel M, Hahn C, Duschl A, Sebald W, Brocker EB, et al. The impact of the route and frequency of antigen exposure on the IgE response in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124(4):461-9.
136. Ebner F, Hepworth MR, Rausch S, Janek K, Niewianda A, Kuhl A, et al. Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. *Allergy*. 2014;69(11):1489-97.
137. Dunkin D, Berin MC, Mayer L. Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvant-dependent manner. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1251-8 e2.
138. Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(10):1572-5.
139. Yamanishi R, Yusa I, Bando N, Terao J. Adjuvant activity of alum in inducing antigen specific IgE antibodies in BALB/c mice: a reevaluation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67(1):166-9.
140. Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Int Immunol*. 2000;12(12):1733-40.

141. Hogenesch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Frontiers in immunology*. 2012;3:406.
142. Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol*. 1998;10(5):651-62.
143. Mu HH, Sewell WA. Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN-gamma in immunized mice given pertussis toxin. *Immunology*. 1994;83(4):639-45.
144. Horner AA, Nguyen MD, Ronaghy A, Cinman N, Verbeek S, Raz E. DNA-based vaccination reduces the risk of lethal anaphylactic hypersensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(2):349-56.
145. Muzio M, Mantovani A. The Toll receptor family. *Allergy*. 2001;56(2):103-8.
146. Weinmann AS, Mitchell DM, Sanjabi S, Bradley MN, Hoffmann A, Liou HC, et al. Nucleosome remodeling at the IL-12 p40 promoter is a TLR-dependent, Rel-independent event. *Nat Immunol*. 2001;2(1):51-7.
147. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
148. Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol*. 2002;168(9):4524-30.
149. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1995;182(5):1591-6.
150. Khodoun MV, Kucuk ZY, Strait RT, Krishnamurthy D, Janek K, Lewkowich I, et al. Rapid polyclonal desensitization with antibodies to IgE and FcεRIα. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(6):1555-64.